

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037293**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.05</p> <p>(21) Номер заявки
201792222</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2016.04.06</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 38/18</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>A61P 19/00</i> (2006.01)
<i>A61P 21/00</i> (2006.01)
<i>A61P 9/00</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>C07K 14/71</i> (2006.01)
<i>C07K 19/00</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) ГЕТЕРОМУЛЬТИМЕРЫ РЕЦЕПТОРОВ ТИПА I И ТИПА II БЕЛКОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА TGF-БЕТА

- | | |
|--|---|
| <p>(31) 62/143,579</p> <p>(32) 2015.04.06</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2018.04.30</p> <p>(86) PCT/US2016/000033</p> <p>(87) WO 2016/164089 2016.10.13</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКСЕЛЕРОН ФАРМА ИНК. (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Кумар Равиндра, Гринберг Ася, Сако Дайанн С., Пирсалл Роберт Скотт, Кастонгэй Роузлин (US)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) CASTONGUAY R. et al., "Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppress tumor growth", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2011, vol. 286, no 34, pages 30034-30046, Materials, last paragraph of first column page 30035
WO-A2-2009134428
WO-A2-2008076437
WO-A1-2010114860
WO-A1-2005084699</p> |
|--|---|

- (57) В некоторых аспектах изобретение относится к растворимым гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим внеклеточный домен серин/треонинового киназного рецептора типа I белков семейства TGF-бета и внеклеточный домен серин/треонинового киназного рецептора типа II белков семейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к растворимым полипептидным комплексам, содержащим внеклеточный домен рецептора типа II, выбранного из ActRIIA, ActRIIB, TGFBR2, BMPRII и MISRII. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к растворимым полипептидным комплексам, содержащим внеклеточный домен рецептора типа I, выбранного из ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7. Необязательно растворимый комплекс представляет собой гетеродимер. В некоторых аспектах такие растворимые полипептидные комплексы можно использовать для регуляции (стимуляции или ингибирования) роста тканей или клеток, включая, например, мышцу, кость, хрящ, жировую ткань, нервную ткань, опухоли, злокачественные клетки и/или клетки гемопоэтических ростков, включая эритроциты. В некоторых аспектах такие растворимые полипептидные комплексы можно использовать для улучшения образования мышц, образования костей, гемопоэза, метаболических параметров и для нарушений, ассоциированных с этими тканями, клеточными сетями и эндокринными системами.

B1**037293****037293****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет временной заявке США с серийным номером 62/143579, поданной 6 апреля 2015 г. Содержание вышеуказанной заявки включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Уровень техники, к которому относится изобретение

Суперсемейство трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) включает различные факторы роста, которые обладают общими элементами последовательности и структурными мотивами. Известно, что эти белки обладают биологическими эффектами на широкое множество типов клеток как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Представители суперсемейства выполняют важные функции в ходе эмбрионального развития при образовании структур и специализации тканей, и они могут влиять на различные процессы дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиогенез, гемопоэз, нейрогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. Это семейство подразделяется на две основных филогенетических клады: более поздно возникшие представители суперсемейства, которые включают белки TGF-бета, активины и nodal, и клада более отдаленно родственных белков этого суперсемейства, которая включает ряд белков BMP и GDF. Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870. Представители семейства TGF-бета обладают различными часто взаимодополняющими биологическими эффектами. Посредством манипулирования активностью представителя семейства TGF-бета часто является возможным обеспечение значительных физиологических изменений в организме. Например, породы коров Piedmontese и Belgian Blue имеют мутацию с утратой функции в гене GDF8 (также называемом миостатином), которая вызывает значительное увеличение мышечной массы. Grobet et al. (1997) Nat Genet., 17(1):71-4. Более того, у человека неактивные аллели GDF8 ассоциированы с увеличенной мышечной массой и, согласно сообщению, исключительной силой. Schuelke et al. (2004) N Engl J Med, 350:2682-8.

Изменения в мышцах, костях, жировой ткани, эритроцитах и других тканях могут быть достигнуты путем усиления или ингибирования передачи сигнала (например, SMAD 1, 2, 3, 5 и/или 8), которая опосредуется лигандами семейства TGF-бета. Таким образом, существует потребность в средствах, которые регулируют активность различных лигандов суперсемейства TGF-бета.

Сущность изобретения

Частично, настоящее изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, содержащим по меньшей мере один полипептид серин/треонинового киназного рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, полипептид ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7), включая его фрагменты и варианты, и по меньшей мере один полипептид серин/треонинового киназного рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII), включая его фрагменты и варианты. В других аспектах изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида серин/треонинового киназного рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, полипептид ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7), включая его фрагменты и варианты. В других аспектах изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида серин/треонин киназного рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII), включая его фрагменты и варианты. Необязательно гетеромультимерные комплексы, описанные в настоящем описании (например, гетеродимер ActRIIB:ALK4) обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда от их соответствующих гомомультимерных комплексов (например, гомодимер ActRIIB и гомодимер ALK4). Новые свойства, включая новые признаки связывания лигандов, демонстрируются гетеромультимерными полипептидными комплексами, содержащими полипептиды рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, как показано в разделе "Примеры" настоящего описания.

Гетеромультимерные структуры включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры и комплексы более высокого порядка. См., например, фиг. 1, 2, 15, 16, 17, 18, 19. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению представляют собой гетеродимеры. Предпочтительно полипептиды рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, как описано в настоящем описании, содержат лиганд-связывающий домен рецептора, например, внеклеточный домен рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета. Таким образом, в некоторых аспектах, белковые комплексы, описанные в настоящем описании, содержат внеклеточный домен рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета, выбранного из: ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII, а также их укороченных форм и вариантов, и внеклеточный домен рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета, выбранного из: ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7, а также их укороченных форм и вариантов. Предпочтительно полипептиды рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, как описано в настоящем описании, а также белковые комплексы, содержащие их, являются растворимыми. В некоторых аспектах гетеромультимерные комплексы по изобретению связываются с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический

фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, мюллерова ингибирующая субстанция (MIS) и Lefty). Необязательно, белковые комплексы по изобретению связываются с одним или несколькими из этих лигандов с K_D 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} или более. Как правило, гетеромультимеры по изобретению являются антагонистами (ингибируют) одного или нескольких видов активности по меньшей мере одного лиганда суперсемейства TGF-бета, и такие изменения активности можно количественно определять с использованием различных способов анализа, известных в данной области, включая, например, клеточный анализ, как описано в настоящем описании. Предпочтительно гетеромультимеры по изобретению демонстрируют время полужизни в сыворотке по меньшей мере 4, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч у млекопитающего (например, мыши или человека). Необязательно, гетеромультимеры по изобретению могут демонстрировать время полужизни в сыворотке по меньшей мере 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25 или 30 суток у млекопитающего (например, мыши или человека).

В некоторых аспектах гетеромультимеры, описанные в настоящем описании, содержат первый полипептид, ковалентно или нековалентно связанный со вторым полипептидом, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность первого представителя взаимодействующей пары, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность второго представителя взаимодействующей пары. В других аспектах гетеромультимеры, описанные в настоящем описании, содержат первый полипептид, ковалентно или нековалентно связанный со вторым полипептидом, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность первого представителя взаимодействующей пары, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность другого полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность второго представителя взаимодействующей пары. В других аспектах гетеромультимеры, описанные в настоящем описании, содержат первый полипептид, ковалентно или нековалентно связанный со вторым полипептидом, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность первого представителя взаимодействующей пары, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность отличающегося полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность второго представителя взаимодействующей пары. Необязательно, полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета связан непосредственно с первым представителем взаимодействующей пары, или между аминокислотной последовательностью полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотной последовательностью первого представителя взаимодействующей пары может быть расположена вставочная последовательность, такая как линкер. Аналогично, полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета может быть связан непосредственно со вторым представителем взаимодействующей пары, или между аминокислотной последовательностью полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотной последовательностью второго представителя взаимодействующей пары может быть расположена вставочная последовательность, такая как линкер. Примеры линкеров включают, но не ограничиваются ими, последовательности TGGG (SEQ ID NO: 62), TGGGG (SEQ ID NO: 60), SGGGG (SEQ ID NO: 61), GGGG (SEQ ID NO: 59) и GGG (SEQ ID NO: 58).

Взаимодействующие пары, описанные в настоящем описании, предназначены для обеспечения димеризации или образования мультимеров более высокого порядка. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующая пара может представлять собой любые две полипептидные последовательности, которые взаимодействуют с образованием комплекса, в частности гетеродимерного комплекса, хотя в применимых вариантах осуществления также может использоваться взаимодействующая пара, которая образует гомодимерную последовательность. Первый и второй представители взаимодействующей пары могут представлять собой асимметричную пару, что означает, что представители пары предпочтительно ассоциируют друг с другом, а не с собой. Таким образом, первый и второй представители асимметричной взаимодействующей пары могут ассоциировать с образованием гетеродимерного комплекса. Альтернативно взаимодействующая пара может быть ненаправленной, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или ассоциировать с собой без значительного предпочтения и, таким образом, могут иметь одинаковые или различающиеся аминокислотные последовательности. Таким образом, первый и второй представители ненаправленной взаимодействующей пары могут ассоциировать с образованием гомодимерного комплекса или гетеродимерного комплекса. Необязательно, первый представитель взаимодействующей пары (например, асимметричной пары или ненаправленной взаимодействующей пары) ковалентно ассоциирует со вторым представителем взаимодействующей пары. Необязательно, первый представитель взаимодействующей пары (например, асимметричной пары или ненаправленной взаимодействующей пары) ассоциирует нековалентно со вторым представителем взаимодействующей пары. Необязательно, первый представитель взаимодействующей пары (например, асимметричной или ненаправленной взаимодействующей пары) ассоциирует как через ковалентные, так и через нековалентные механизмы со вторым представителем взаимодействующей пары.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета представляют собой слитые белки, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета представляют собой слитые белки, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина. Традиционные слитые с Fc белки и антитела являются примерами ненаправленных взаимодействующих пар, в то время как различные сконструированные Fc-домены были разработаны в качестве асимметричных взаимодействующих пар [Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A):95-106]. Таким образом, первый представитель и/или второй представитель взаимодействующей пары, описанной в настоящем описании, может содержать константный домен иммуноглобулина, включая, например, Fc-часть иммуноглобулина. Например, первый представитель взаимодействующей пары может содержать аминокислотную последовательность, которая происходит из Fc-домена иммуноглобулина IgG (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (IgA1 или IgA2), IgE или IgM. Например, первый представитель взаимодействующей пары может содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 200-214. Необязательно, второй представитель взаимодействующей пары может содержать аминокислотную последовательность, которая происходит из Fc-домена IgG (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (IgA1 или IgA2), IgE или IgM. Такие домены иммуноглобулинов могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот (например, делеций, вставок и/или замен), которые способствуют образованию гетеродимера. Например, второй представитель взаимодействующей пары может содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 200-214. В некоторых вариантах осуществления первый представитель и второй представитель взаимодействующей пары содержат Fc-домены, происходящие из одного и того же класса и подтипа иммуноглобулинов. В других вариантах осуществления первый представитель и второй представитель взаимодействующей пары содержат Fc-домены, происходящие из различных классов или подтипов иммуноглобулинов. Аналогично, первый представитель и/или второй представитель взаимодействующей пары (например, асимметричной пары или ненаправленной взаимодействующей пары) содержит модифицированный константный домен иммуноглобулина, включая, например, модифицированную Fc-часть иммуноглобулина. Например, белковые комплексы по изобретению могут содержать первую модифицированную Fc-часть иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы: SEQ ID NO: 200-214, и вторую модифицированную Fc-часть иммуноглобулина, которая может быть такой же или может отличаться от аминокислотной последовательности первой модифицированной Fc-части иммуноглобулина, содержащей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы: SEQ ID NO: 200-214. Такие домены иммуноглобулинов могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот (например, делеций, вставок и/или замен), которые способствуют образованию гетеродимера.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим полипептид рецептора типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, где полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ActRIIA. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ActRIIA. Например, полипептиды ActRIIA могут содержать, по существу состоять из или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ActRIIA, описанной в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452). Необязательно, полипептиды ActRIIA могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 21-30 (например, аминокислотные остатки 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) SEQ ID NO: 9, и б) оканчивается любой из аминокислот 110-135 (например, 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 или 135) SEQ ID NO: 9. Необязательно, полипептиды ActRIIA по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые являются гетерологичными для ActRIIA. Например, полипептид ActRIIA может быть слитым с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ActRIIA и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых аспектах гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ActRIIA, дополнительно содержат по меньшей мере один полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать поли-

пептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. Необязательно, полипептиды ALK1 в этом и других вариантах осуществления могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 22-34 (например, аминокислотные остатки 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34) SEQ ID NO: 14, и б) оканчивается любой из аминокислот 95-118 (например, аминокислотные остатки 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 и 118) SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. Необязательно, полипептиды ALK2 в этом и других вариантах осуществления могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 21-35 (например, аминокислотные остатки 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 и 35) SEQ ID NO: 18, и б) оканчивается любой из аминокислот 99-123 (например, аминокислотные остатки 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 и 123) SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. Необязательно, в этом и других вариантах осуществления полипептиды ALK3 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 24-61 (например, аминокислотные остатки 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 и 61) SEQ ID NO: 22, и б) оканчивается любой из аминокислот 130-152 (например, аминокислотные остатки 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 и 152) SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. Необязательно, в этом и других вариантах осуществления полипептиды ALK4 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 23-34 (например, аминокислотные остатки 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34) SEQ ID NO: 26 или 83, и б) оканчивается любой из аминокислот 101-126 (например, аминокислотные остатки 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 и 126) SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. Необязательно, в этом и других вариантах осуществления полипептиды ALK5 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 25-36 (например, аминокислотные остатки 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 и 36) SEQ ID NO: 30 или 87, и б) оканчивается любой из аминокислот 106-126 (например, аминокислотные остатки 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126) SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. Необязательно, в этом и других вариантах осуществления полипептиды ALK6 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 14-32 (например, аминокислотные остатки 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32) SEQ ID NO: 34, и б) оканчи-

вается любой из аминокислот 102-126 (например, аминокислотные остатки 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126) SEQ ID NO: 34. Необязательно, в этом и других вариантах осуществления полипептиды ALK6 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 26-62 (например, аминокислотные остатки 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 и 62) SEQ ID NO: 91, и б) оканчивается любой из аминокислот 132-156 (например, аминокислотные остатки 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155 и 156) SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476. Необязательно, в этом и других вариантах осуществления, полипептиды ALK7 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который начинается с любой из аминокислот 21-28 SEQ ID NO: 38 (например, аминокислоты 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28) и оканчивается любой из аминокислот 92-113 SEQ ID NO: 38 (например, аминокислоты 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или 113 SEQ ID NO: 38). В некоторых аспектах гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ActRIIA, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ActRIIB, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид BMPRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид MISRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид TGFBRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим полипептид рецептора типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, где полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ActRIIB. Например, полипептиды ActRIIB могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ActRIIB, описанной в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454). Необязательно, полипептиды ActRIIB могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 20-29 (например, аминокислотные остатки 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) SEQ ID NO: 1, и б) оканчивается любой из аминокислот 109-134 (например, аминокислотные остатки 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 или 134) SEQ ID NO: 1. Необязательно, полипептиды ActRIIB по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ActRIIB. Например, полипептид ActRIIB может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ActRIIB и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один

компонент взаимодействующей пары. Предпочтительно гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ActRIIB, дополнительно содержат по меньшей мере один полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476. В некоторых аспектах гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ActRIIB, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ActRIIA может дополнительно содержать полипептид ActRIIB, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. Например, гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид ActRIIA, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид BMPRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид MISRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ActRIIB может дополнительно содержать полипептид TGFBRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим полипептид рецептора типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, где полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора TGFBRII. В

некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора TGFBR2. Например, полипептиды TGFBR2 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности TGFBR2, описанной в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462). Необязательно, полипептиды TGFBR2 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51 SEQ ID NO: 42, и б) оканчивается любой из аминокислот 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165 или 166 SEQ ID NO: 42. Необязательно, полипептиды TGFBR2 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44 SEQ ID NO: 67, и б) оканчивается любой из аминокислот 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190 или 191 SEQ ID NO: 67. Необязательно, полипептиды TGFBR2 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны TGFBR2. Например, полипептид TGFBR2 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом TGFBR2 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. Предпочтительно гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид TGFBR2, дополнительно содержат по меньшей мере один полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR2 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476. Необязательно, гетеромерные комплексы, содержащие полипептид TGFBR2, могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, включая, например, полипептиды ActRIIA, ActRIIB, BMPRII и MISRII, описанные в настоящем описании (например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 46,

47, 50, 51, 71, 72, 75, 76, 79, 80, 100, 102, 118, 120, 121, 123, 401, 402, 409, 410, 411 и 412). В некоторых аспектах гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид TGFBR1I, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс TGFBR1I может дополнительно содержать полипептид ActRIIA, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR1I может дополнительно содержать полипептид ActRIIB, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR1I может дополнительно содержать полипептид MISRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс TGFBR1I может дополнительно содержать полипептид BMPRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим полипептид рецептора типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, где полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора BMPRII. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора BMPRII. Например, полипептиды BMPRII могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности BMPRII, описанные в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456). Необязательно, полипептиды BMPRII могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 27-34 (например, аминокислотные остатки 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34) SEQ ID NO: 46 или 71, и б) оканчивается любой из аминокислот 123-150 (например, аминокислотные остатки 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 и 150) SEQ ID NO: 46 или 71. Необязательно, полипептиды BMPRII по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны BMPRII. Например, полипептид BMPRII может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом BMPRII и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. Предпочтительно гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид BMPRII, дополнительно содержат по меньшей мере один полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469

и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476. В некоторых аспектах гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид BMPRII, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ActRIIA, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид ActRIIB, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид MISRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс BMPRII может дополнительно содержать полипептид TGFBRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим полипептид рецептора типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, где полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора MISRII. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора MISRII. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора MISRII. Например, полипептиды MISRII могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности MISRII, описанной в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458). Необязательно, полипептиды MISRII могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 17-24 (например, аминокислотные остатки 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24) SEQ ID NO: 50, 75 или 79, и б) оканчивается любой из аминокислот 116-149 (например, аминокислотные остатки 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148 и 149) SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Необязательно, полипептиды MISRII по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны MISRII. Например, полипептид MISRII может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом MISRII и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. Предпочтительно гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид MISRII, дополнительно содержат по меньшей мере один полипептид рецептора типа I белков суперсе-

мейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476. В некоторых аспектах гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид MISRII, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ActRIIA, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид ActRIIB, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать an BMPRII полипептид как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс MISRII может дополнительно содержать полипептид TGFBRII, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK1. Например, полипептиды ALK1 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK1, описанной в настоящем описании (например, 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464). Необязательно, полипептиды ALK1 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с

любой из аминокислот 22-34 (например, аминокислотные остатки 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34) SEQ ID NO: 14, и b) оканчивается любой из аминокислот 95-118 (например, аминокислотные остатки 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 и 118) SEQ ID NO: 14. Необязательно, полипептиды ALK1 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK1. Например, полипептид ALK1 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK1 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK1, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK1 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK1 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK1 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK1 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK1 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK1 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK2. Например, полипептиды ALK2 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK2, описанной в настоящем описании (например, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466). Необязательно, полипептиды ALK2 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 21-35 (например, аминокислотные остатки 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 и 35) SEQ ID NO: 18, и b) оканчивается любой из аминокислот 99-123 (например, аминокислотные остатки 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 и 123) SEQ ID NO: 18. Необязательно, полипептиды ALK2 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK2. Например, полипептид ALK2 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK2 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK2, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK2 может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности,

которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK2 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK2 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK2 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK2 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK2 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK3. Например, полипептиды ALK3 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK3, описанной в настоящем описании (например, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468). Необязательно, полипептиды ALK3 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 24-61 (например, аминокислотные остатки 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 и 61) SEQ ID NO: 22, и б) оканчивается любой из аминокислот 130-152 (например, аминокислотные остатки 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 и 152) SEQ ID NO: 22. Необязательно, полипептиды ALK3 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK3. Например, полипептид ALK3 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK3 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK3, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK3 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK3 может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK3 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK3 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последова-

тельности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK3 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK3 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK4. Например, полипептиды ALK4 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK4, описанной в настоящем описании (например, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470). Необязательно, полипептиды ALK4 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 23-34 (например, аминокислотные остатки 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34) SEQ ID NO: 26 или 83, и б) оканчивается любой из аминокислот 101-126 (например, аминокислотные остатки 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 и 126) SEQ ID NO: 26 или 83. Необязательно, полипептиды ALK4 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK4. Например, полипептид ALK4 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK4 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK4, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK4 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK4 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK4 может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK4 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK4 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK4 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков супер-

семейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK5. Например, полипептиды ALK5 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK5, описанной в настоящем описании (например, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472). Необязательно, полипептиды ALK5 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 25-36 (например, аминокислотные остатки 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 и 36) SEQ ID NO: 30 или 87, и б) оканчивается любой из аминокислот 106-126 (например, аминокислотные остатки 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126) SEQ ID NO: 30 или 87. Необязательно, полипептиды ALK5 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK5. Например, полипептид ALK5 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK5 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK5, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK5 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK5 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK5 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK5 может дополнительно содержать полипептид ALK1 как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK5 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK5 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK6. Например, полипептиды ALK6 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK6, описанной в настоящем описании (например, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474). Необязательно, полипептиды ALK6 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 14-32 (например, аминокислотные остатки 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32) SEQ ID NO: 34, и б) оканчивается любой из аминокислот 102-126 (например, аминокислотные остатки 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126) SEQ ID NO: 34. Необязательно, полипептиды ALK6 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, который а) начинается с любой из аминокислот 26-62 (например, аминокислотные остатки 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,

37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 и 62) SEQ ID NO: 91, и b) оканчивается любой из аминокислот 132-156 (например, аминокислотные остатки 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155 и 156) SEQ ID NO: 91. Необязательно, полипептиды ALK6 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK6. Например, полипептид ALK6 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK6 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK6, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK6 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK6 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK6 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK6 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK6 может дополнительно содержать полипептид ALK1, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK6 может дополнительно содержать полипептид ALK7, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета происходит из рецептора ALK7. Например, полипептиды ALK7 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности ALK7, описанной в настоящем описании (например, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476). Необязательно, полипептиды ALK7 могут содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична полипептиду, которая начинается с любой из аминокислот 21-28 SEQ ID NO: 38 (например, аминокислоты 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28) и оканчивается любой из аминокислот 92-113 SEQ ID NO: 38 (например, аминокислоты 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или 113 SEQ ID NO: 38). Необязательно, полипептиды ALK7 по изобретению могут представлять собой слитые белки, которые дополнительно содержат одну или несколько частей (доменов), которые гетерологичны ALK7. Например, полипептид ALK7 может быть слит с гетерологичным полипептидом, который содержит домен мультимеризации, необязательно с линкерным доменом, расположенным между полипептидом ALK7 и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации, описанные в настоящем описании, содержат один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления гетеромерные комплексы, которые содержат полипептид ALK7, дополнительно содержат по меньшей мере один отличающийся полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Например, гетеромерный комплекс ALK7 может дополнительно содержать полипептид ALK2, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID

NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK7 может дополнительно содержать полипептид ALK3, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK7 может дополнительно содержать полипептид ALK4, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK7 может дополнительно содержать полипептид ALK5, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK7 может дополнительно содержать полипептид ALK6, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474. В некоторых вариантах осуществления гетеромерный комплекс ALK7 может дополнительно содержать полипептид ALK1 как описано в настоящем описании, включая, например, полипептид, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанные в настоящем описании, содержат один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из: гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной частью, и аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанные в настоящем описании, являются гликозилированными и имеют характер гликозилирования, достигаемый посредством экспрессии полипептидов в клетке млекопитающего, включая, например, клетку CHO.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанных в настоящем описании. Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем описании, могут быть функционально связаны с промотором для экспрессии, и изобретение, кроме того, относится к клеткам, трансформированным такими рекомбинантными полинуклеотидами. Предпочтительно клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка COS или клетка CHO.

В некоторых аспектах изобретение относится к способам получения любых полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанных в настоящем описании, а также белковых комплексов, содержащих такие полипептиды. Такой способ может включать экспрессию любых из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, в подходящей клетке (например, клетка CHO или клетка COS). Такой способ может включать: а) культивирование клетки в условиях, пригодных для экспрессии полипептидов рецепторов типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета, где указанная клетка трансформирована конструкцией, экспрессирующей полипептид рецептора типа I или типа II; и б) выделение полипептидов рецепторов типа I или типа II, экспрессированных таким образом. Полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанные в настоящем описании, а также их белковые комплексы, можно выделять в качестве неочищенных, частично очищенных или в высокой степени очищенных фракций с использованием любых из хорошо известных способов получения белка из клеточных культур.

В некоторых аспектах изобретение относится к способам получения любых из гетеромультимерных комплексов, описанных в настоящем описании. Такой способ может включать экспрессию любых из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, в подходящей клетке (например, клетка CHO или клетка COS). Такой способ может включать: а) получение клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, содержащую кодирующую последовательность для полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета, описанного в настоящем описании, и нуклеиновую кислоту, содержащую кодирующую последовательность для полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанного в настоящем описании; (b) культивирование такой клетки в условиях, подходящих для экспрессии полипептидов рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанных в настоящем описании; и с) выделение гетеромерного комплекса, содержащего такие полипептиды типа I и типа II, экспрессированные таким образом. Гетеромультимерные комплексы, описанные в настоящем описании, можно выделять в качестве неочищенных, частично очищенных или в высокой степени очищенных

фракций с использованием любого из хорошо известных способов получения белка из клеточных культур.

Любые из белковых комплексов, описанных в настоящем описании, могут быть включены в фармацевтический препарат. Необязательно, такие фармацевтические препараты являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% чистыми относительно других полипептидных компонентов. Необязательно, фармацевтические препараты, описанные в настоящем описании, могут содержать одно или несколько дополнительных активных веществ. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат менее 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа I. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат менее 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа II. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат менее 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа I и менее 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа II.

Кроме того, изобретение относится к способам и гетеромультимерным комплексам для применения для лечения или предупреждения различных заболеваний и нарушений, ассоциированных, например, с мышечной, костной, жировой тканью, эритроцитами и другими тканями, на которые оказывает негативное воздействие один или несколько лигандов суперсемейства TGF-бета. Такие заболевания и нарушения включают, но не ограничиваются ими, нарушения, ассоциированные с потерей мышечной ткани или недостаточным ростом мышц (например, мышечная атрофия; мышечная дистрофия, включая мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера и плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию; боковой амиотрофический склероз и хахексию), и нарушения, ассоциированные с нежелательным увеличением массы тела (например, ожирение, диабет 2 типа или неинсулинзависимый сахарный диабет (NIDDM), сердечно-сосудистое заболевание, гипертензия, остеоартрит, инсульт, респираторные проблемы и заболевание желчного пузыря). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы, описанные в настоящем описании, можно использовать для уменьшения содержания жира в организме или снижения скорости увеличения содержания жира в организме у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы, описанные в настоящем описании, можно использовать для снижения уровней холестерина и/или триглицеридов у пациента.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A и 1B показано два схематичных примера гетеромерных белковых комплексов, содержащих полипептиды рецепторов типа I и типа II. На фиг. 1A представлен гетеродимерный белковый комплекс, содержащий один слитый полипептид рецептора типа I и один слитый полипептид рецептора типа II, который может быть собран ковалентно или нековалентно через домен мультимеризации, содержащийся в каждой полипептидной цепи. Два собранных домена мультимеризации составляют взаимодействующую пару, которая может быть либо направленной, либо ненаправленной. На фиг. 2A представлен гетеромерный белковый комплекс, содержащий два гетеродимерных комплекса, как и на фиг. 1A. Могут предусматриваться комплексы более высокого порядка.

На фиг. 2 показан схематичный пример гетеромерного белкового комплекса, содержащего полипептид рецептора типа I (указан как "I") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 или ALK7 человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476), и полипептид рецептора типа II (указан как "II") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIA, ActRIIB, MISRII, BMPRII или TGFBRII человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462). В проиллюстрированном варианте осуществления полипептид рецептора типа I является частью слитого полипептида, который содержит первый представитель взаимодействующей пары ("C"), и полипептид рецептора типа II представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("D"). В каждом слитом полипептиде между полипептидом рецептора типа I или типа II и соответствующим представителем взаимодействующей пары может находиться линкер. Первый и второй представители взаимодействующей пары (C, D) могут представлять собой направленную (асимметричную) пару, что означает, что представители пары ассоциируют предпочтительно друг с другом, а не сами с собой, или взаимодействующая пара может быть ненаправленной, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или сами с собой без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различающиеся аминокислотные последовательности. Традиционные слитые белки Fc и антитела являются примерами ненаправленных взаимодействующих пар, в то время как множество сконструированных Fc-

доменов были разработаны в качестве направленных (асимметричных) взаимодействующих пар [например, Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106].

На фиг. 3 показано выравнивание внеклеточных доменов ActRIIA человека (SEQ ID NO: 500) и ActRIIB человека (SEQ ID NO: 2) с остатками, установленными в рамках настоящего изобретения на основе полного анализа множества кристаллических структур ActRIIB и ActRIIA в качестве непосредственно контактирующих с лигандом, указанными с помощью рамок.

На фиг. 4 показано множественное выравнивание последовательностей различных белков-предшественников ActRIIB позвоночных без их внутриклеточных доменов (SEQ ID NO: 501, 502, 503, 504, 505 и 506 соответственно), белка-предшественника ActRIIA человека без его внутриклеточного домена (SEQ ID NO: 507) и консенсусного белка-предшественника ActRII (SEQ ID NO: 508).

На фиг. 5 показано множественное выравнивание последовательностей Fc-доменов из изоформ IgG человека с использованием Clustal 2.1. Шарнирные области указаны пунктирной линией. Двойным подчеркиванием указаны примеры положений, модифицированных способами инженерии в Fc IgG1 для способствования асимметричному образованию пар цепей, и соответствующие положения в отношении других изоформ IgG2, IgG3 и IgG4.

На фиг. 6 показаны данные о связывании лиганда гетеродимерным белковым комплексом ActRIIB-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK4-Fc. Для каждого белкового комплекса лиганды ранжированы по k_{off} , кинетической константе, которая коррелирует с ингибированием передачи сигнала лигандом, и приведены в нисходящем порядке аффинности связывания (лиганды, связывающиеся наиболее прочно, указаны сверху). Слева желтая, красная, зеленая и синяя линии указывают на порядок величины константы скорости диссоциации. Сплошными черными линиями указаны лиганды, связывание которых с гетеродимером усиливается или не изменяется по сравнению с гомодимером, в то время как пунктирными красными линиями указано существенно сниженное связывание по сравнению с гомодимером. Как показано, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc демонстрирует усиленное связывание с активином В по сравнению с любым гомодимером, сохраняет прочное связывание с активином А, GDF8 и GDF11, как наблюдают для гомодимера ActRIIB-Fc, и демонстрирует существенно сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3. Подобно гомодимеру ActRIIB-Fc, гетеродимер сохраняет промежуточный уровень связывания с BMP6.

На фиг. 7 показаны данные связывания лигандов гетеродимерным белковым комплексом ActRIIB-Fc:ALK3-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK3-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc связывает BMP2 и BMP4 с исключительно высокой аффинностью и демонстрирует в значительной степени усиленное связывание с BMP5, BMP6, BMP7, GDF5, GDF6 и GDF7 по сравнению с любым гомодимером. По сравнению с гомодимером ActRIIB, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc демонстрирует сниженное связывание с активином А, активином В, BMP10, GDF8 и GDF11, а также в большей степени различает эти лиганды, в частности, активин А и активин В. Кроме того, способность гомодимера ActRIIB-Fc связывать BMP9 и GDF3 с высокой аффинностью отсутствует у гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK3-Fc.

На фиг. 8 показаны данные связывания лигандов гетеродимерным белковым комплексом ActRIIB-Fc:ALK7-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK7-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, четыре из пяти лигандов с сильным связыванием с гомодимером ActRIIB-Fc (активин А, BMP10, GDF8 и GDF11) демонстрируют сниженное связывание с гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc, за исключением активина В, который сохраняет прочное связывание с гетеродимером. Кроме того, три лиганда с промежуточным связыванием с гомодимером ActRIIB-Fc (GDF3, BMP6 и, в частности, BMP9) демонстрируют сниженное связывание с гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc. Напротив, BMP5 связывает гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7 с промежуточной прочностью, несмотря на только слабое связывание с гомодимером ActRIIB-Fc. Ни один из исследованных лигандов не связывается с гомодимером ALK7-Fc.

На фиг. 9 показаны данные связывания лигандов гетеродимерным белковым комплексом ActRIIB-Fc:ALK2-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK2-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc демонстрирует предпочтительное и прочное связывание с активином В, таким образом, являясь сходным с гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc (фиг. 8). Однако гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc отличается от ActRIIB-Fc:ALK7-Fc частично вследствие сохранения прочного связывания с BMP9, характерного для гомодимера ActRIIB-Fc. Ни один из исследованных лигандов не связывается с гомодимером ALK2-Fc.

На фиг. 10 представлены данные связывания лигандов гетеродимерным белковым комплексом ActRIIA-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIA-Fc и гомодимером ALK4-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc демонстрирует усиленное связывание с активином А, и, в частности, усиленное связывание с активином АС, по сравнению с гомодимером ActRIIA-Fc, при сохранении прочного связывания с активином АВ и GDF11. Кроме того, лиганд с наиболее высокой аффинностью в отношении гомодимера ActRIIA-Fc, активин В, демонстрирует сниженную аффинность (хотя все еще в пределах диапазона высокой аффинности) в отношении гетеродимера ActRIIA-Fc:ALK4-Fc. Гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc также демонстрирует значительно сни-

женное связывание с BMP10 по сравнению с гомодимером ActRIIA-Fc.

На фиг. 11 показаны данные связывания лигандов гетеродимерным белковым комплексом BMPRII-Fc:ALK1-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK1-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc по большей части сохраняет прочное связывание с BMP9 и BMP10, характерное для гомодимера ALK1-Fc; однако гетеродимер демонстрирует умеренную селективность для BMP10 относительно BMP9, не присутствующую у гомодимера. Также в отличие от гомодимера ALK1-Fc, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc связывается с BMP15, хотя и с скоростью диссоциации, приблизительно в десять раз более высокой, чем у гомодимера BMPRII-Fc.

На фиг. 12 представлены данные связывания лигандов гетеродимерным белковым комплексом BMPRII-Fc:ALK3-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK3-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK3-Fc связывается значительно более прочно с BMP6, чем гомодимер ALK3-Fc, что отражает скорость диссоциации, практически в десять раз более низкую. Обладающий по большей степени неизменным связыванием с BMP2 и BMP4 гетеродимер BMPRII-Fc:ALK3, таким образом, можно считать общим ингибитором BMP2, BMP4 и BMP6. Этот профиль связывания контрастирует с профилем связывания гомодимера ALK3-Fc, у которого исключительно прочное связывание с BMP4 и BMP2 идентифицирует его в качестве в высокой степени селективного в отношении этой пары лигандов по сравнению с четырьмя лигандами с промежуточным уровнем связывания, включая BMP6.

На фиг. 13 представлены данные связывания лигандов для гетеродимерного белкового комплекса BMPRII-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK4-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc отличается от обоих гомодимеров вследствие связывания нескольких лигандов активина с высокой и промежуточной прочностью и отличается от гомодимера BMPRII-Fc связыванием BMP15 только слабо. Наиболее примечательно, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc связывается прочно и с высокой селективностью с его гетеродимерным лигандом активином AB.

На фиг. 14 представлены данные связывания лигандов для двух различных гетеродимерных белковых комплексов TGFβRII-Fc:ALK5-Fc по сравнению с гомодимером TGFβRII-Fc и гомодимером ALK5-Fc. Формат является таким же, как и на фиг. 6. Как показано, гетеродимеры TGFβRII-Fc:ALK5-Fc значительно отличаются от гомодимера TGFβRII-Fc их высокой селективностью в отношении TGFβ2, все еще сохраняя значительную аффинность в отношении TGFβ1 и TGFβ3. Гетеродимер, включающий длинную изоформу TGFβRII, связывал TGFβ2 более прочно и селективно, чем его аналог с короткой изоформой. Ни один из приведенных лигандов не связывался с гомодимером ALK5-Fc.

На фиг. 15A-15D представлены схематичные примеры гетеромерных белковых комплексов, содержащих полипептид рецептора типа I (указан как "I") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 или ALK7 человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476) и полипептид рецептора типа II (указан как "II") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIA, ActRIIB, MISRII, BMPRII или TGFβRII человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462). В проиллюстрированных вариантах осуществления полипептид рецептора типа I является частью слитого полипептида, который содержит первый представитель взаимодействующей пары ("C₁"), и полипептид рецептора типа II является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("C₂"). Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина, их укорочения и варианты, как описано в настоящем описании [например, Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A):95-106]. В каждом слитом полипептиде между полипептидом рецептора типа I или полипептидом рецептора типа II и соответствующим представителем взаимодействующей пары может быть расположен линкер. Первый и второй представители взаимодействующей пары могут быть ненаправленными, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или ассоциировать с собой без существенного предпочтения, и они могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. См. фиг. 15A. Альтернативно взаимодействующая пара может представлять собой направленную (асимметричную) пару, что означает, что представители пары ассоциируют предпочтительно друг с другом, а с собой. См. фиг. 15B. Могут предусматриваться комплексы более высокого порядка. См. фиг. 15C и 15D.

На фиг. 16A-16C показаны схематичные примеры гетеромерных белковых комплексов, содержа-

ших два полипептида рецепторов типа I (указаны как "I") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 или ALK7 человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476), и два полипептида рецепторов типа II (указаны как "II") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIA, ActRIIB, MISRII, BMPRII или TGFBRII человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 419, 460, 461 и 462).

В проиллюстрированных вариантах осуществления 16A первый полипептид рецептора типа I (слева направо) является частью слитого полипептида, который содержит первый представитель взаимодействующей пары ("C₁") и, кроме того, содержит дополнительный первый представитель взаимодействующей пары ("A₁"); и второй полипептид рецептора типа I представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("C₂") и, кроме того, содержит первый представитель взаимодействующей пары ("A₂"). Первый полипептид рецептора типа II (слева направо) является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("B₁"); и второй полипептид рецептора типа II является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("B₂"). A₁ и A₂ могут быть одинаковыми или могут различаться; B₁ и B₂ могут быть одинаковыми или могут различаться, и C₁ и C₂ могут быть одинаковыми или могут различаться. В каждом слитом полипептиде между полипептидом рецептора типа I или полипептидом рецептора типа II и соответствующим представителем взаимодействующей пары, а также между взаимодействующими парами может находиться линкер. Фиг. 9A является примером ассоциации ненаправленных взаимодействующих пар, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или ассоциировать с собой без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности.

В проиллюстрированных вариантах осуществления 16B первый полипептид рецептора типа I (слева направо) является частью слитого полипептида, который содержит первый представитель взаимодействующей пары ("C₁") и, кроме того, содержит дополнительный первый представитель взаимодействующей пары ("A₁"); и второй полипептид рецептора типа II ActRIIB представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("B₂"). Первый полипептид рецептора типа I (слева направо) является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("B₁"); и второй полипептид рецептора типа I является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("C₂") и, кроме того, содержит первый представитель взаимодействующей пары ("A₂"). В каждом слитом полипептиде между полипептидом рецептора типа I или рецептора типа II и соответствующим представителем взаимодействующей пары, а также между взаимодействующими парами может находиться линкер. Фиг. 16B представляет собой пример ассоциации направленных (асимметричных) взаимодействующих пар, что означает, что представители пары ассоциируют предпочтительно друг с другом, а не с собой.

Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина, их укорочения варианты, как описано в настоящем описании [например, Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Могут предусматриваться комплексы более высокого порядка. См. фиг. 16C-16F. С использованием сходных способов, в частности, способов, в которых используются легкая цепь и/или тяжелая цепь иммуноглобулина, их укорочения или варианты, взаимодействующие пары можно использовать для получения гетеродимеров, которые являются сходными с комплексами Fab и F(ab')₂ антител [например, Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. См. фиг. 16G.

На фиг. 17A и 17B показаны схематичные примеры гетеромерного белкового комплекса, содержащего полипептид рецептора типа I (указан как "I") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 или ALK7 человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476), и полипептид рецептора типа II (указан как "II") (например, полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIA, ActRIIB, MISRII, BMPRII или TGFBRII человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155,

156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462), и лиганд-связывающий домен антитела (например, лиганд-связывающий домен, происходящий из антитела, которое связывается с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF-бета). В проиллюстрированных вариантах осуществления полипептид рецептора типа I является частью слитого полипептида, который содержит первый представитель взаимодействующей пары ("C₁"), и, кроме того, содержит дополнительный первый представитель взаимодействующей пары ("A₁"). Полипептид рецептора типа II является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("B₁"). Полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("C₂"), и, кроме того, содержит первый представитель взаимодействующей пары ("A₂"). Полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("B₂"). В каждом слитом полипептиде между полипептидом рецептора типа I или полипептидом рецептора типа II и соответствующим представителем взаимодействующей пары, между взаимодействующими парами, и между полипептидами V_H и V_L и представителем взаимодействующей пары может находиться линкер. A₁ и A₂ могут быть одинаковыми или могут различаться; B₁ и B₂ могут быть одинаковыми или могут различаться, и C₁ и C₂ могут быть одинаковыми или могут различаться. Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина, их укорочения варианты, как описано в настоящем описании [например, Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Фиг. 17A является примером ассоциации направленных (асимметричных) взаимодействующих пар, что означает, что представители пары ассоциируют предпочтительно друг с другом, а не с собой. Фиг. 17B является примером ассоциации ненаправленных взаимодействующих пар, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или ассоциировать с собой без существенного предпочтения или могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности.

На фиг. 18 показаны схематичные примеры одноцепочечных полипептидов-ловушек рецептор типа I: рецептор типа II. Одноцепочечные полипептиды-ловушки рецептор типа I: рецептор типа II могут содержать множество доменов рецепторов типа I (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 или более доменов), имеющих одинаковые или различные последовательности, и множество доменов рецепторов типа II (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 или более домены), имеющих одинаковые или различные последовательности. Эти домены рецепторов типа I и рецепторов типа II могут быть расположены в любом порядке и могут содержать один или несколько линкеров, расположенных между одним или несколькими доменами рецепторов типа I и рецепторов типа II. Такие ловушки лигандов могут быть пригодными в качестве лекарственных средств для лечения или предупреждения заболеваний или нарушений, описанных в настоящем описании.

На фиг. 19A-19D представлены схематичные примеры мультимерных белковых комплексов, содержащих по меньшей мере один одноцепочечный полипептид-ловушку рецептор типа I: рецептор типа II. В проиллюстрированных вариантах осуществления 19A и 19B, первый одноцепочечный полипептид-ловушка рецептор типа I: рецептор типа II (слева направо) является частью слитого полипептида, который содержит первый представитель взаимодействующей пары ("C₁"); и второй одноцепочечный полипептид-ловушка рецептор типа I: рецептор типа II является частью слитого полипептида, который содержит второй представитель взаимодействующей пары ("C₂"). C₁ и C₂ могут быть одинаковыми или могут различаться. Первый и второй одноцепочечные полипептиды-ловушки рецептор типа I: рецептор типа II могут быть одинаковыми или могут различаться. В каждом слитом полипептиде между одноцепочечным полипептидом-ловушкой рецептор типа I: рецептор типа II и соответствующим представителем взаимодействующей пары может находиться линкер. Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина, их укорочения и варианты, как описано в настоящем описании [например, Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Фиг. 19A является примером ассоциации ненаправленных взаимодействующих пар, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или ассоциировать с собой без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. Фиг. 19B является примером ассоциации направленных (асимметричных) взаимодействующих пар, что означает, что представители пары предпочтительно ассоциируют друг с другом, а не с собой. Могут предусматриваться комплексы более высокого порядка. Кроме того, такие одноцепочечные полипептиды-ловушки рецептор типа I: рецептор типа II аналогично могут ассоциировать, ковалентно или нековалентно, с одним или несколькими полипептидами рецептора типа I и/или одним или несколькими полипептидами рецептора типа II. См. фиг. 19C. Также такие одноцепочечные полипептиды рецептор типа I: рецептор типа II аналогично могут ассоциировать, ковалентно или нековалентно, с одним или несколькими лиганд-связывающими доменами антитела (например, лиганд-связывающий домен антитела, который связывается с одним или несколькими лигандами, связывающими гетеромультимер рецептор типа I: рецептор типа II). См. фиг. 19D.

Подробное описание изобретения

1. Обзор.

Частично, настоящее изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, содержащим внеклеточный домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF β и внеклеточный домен полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF β , гетеромультимерным комплексам, содержащим внеклеточный домен по меньшей мере двух различных полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF β , гетеромультимерным комплексам, содержащим внеклеточный домен по меньшей мере двух различных полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF β , к способам получения таких гетеромультимерных комплексов и к их применению. Как описано в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы могут содержать внеклеточный домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF β , выбранного из: ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления эти гетеромультимерные комплексы могут содержать внеклеточный домен полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF β , выбранного из: ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению обладают измененной специфичностью/профилем связывания лиганда суперсемейства TGF β относительно соответствующего образца гомомультимерного комплекса (например, гетеродимер ActRIIB:ALK4 по сравнению с гомодимерным комплексом ActRIIB:ActRIIB или гомодимерным комплексом ALK4:ALK4).

Суперсемейство TGF- β содержит более 30 секретируемых факторов, включая белки TGF-бета, активины, белки nodal, костные морфогенетические белки (BMP), факторы роста и дифференцировки (GDF) и антимюллеров гормон (AMH). См., например, Weiss et al. (2013) *Developmental Biology*, 2(1): 47-63. Представители суперсемейства, которые встречаются как у позвоночных, так и беспозвоночных, экспрессируются повсеместно в различных тканях и функционируют с наиболее ранних стадий развития на протяжении жизни животного. Действительно, белки суперсемейства TGF- β являются ключевыми медиаторами самообновления стволовых клеток, гастрюляции, дифференцировки, морфогенеза органов и гомеостаза взрослых тканей. В соответствии с этой повсеместно встречающейся активностью, нарушение передачи сигнала белками суперсемейства TGF-бета ассоциировано с широким диапазоном патологий у человека, включая, например, аутоиммунное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, фиброзное заболевание и злокачественную опухоль.

Лиганды суперсемейства TGF-бета обладают общей димерной структурой, в которой центральная спираль, имеющая 3-1/2 оборота, одного мономера упаковывается против углубленной поверхности, образованной бета-цепями другого мономера. Большинство представителей семейства TGF-бета дополнительно стабилизированы межмолекулярными дисульфидными связями. Эта дисульфидная связь проходит через кольцо, образованное двумя другими дисульфидными связями, образуя так называемый мотив "цистеинового узла". См., например, Lin et al. (2006) *Reproduction* 132: 179-190 и Hinck et al. (2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870.

Передача сигнала белками суперсемейства TGF-бета опосредуется гетеромерными комплексами серин/треониновых киназных рецепторов типа I и типа II, которые фосфорилируют и активируют ниже расположенные белки SMAD (например, белки SMAD 1, 2, 3, 5 и 8) при стимуляции лигандом. См., например, Massagué (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178. Эти рецепторы типа I и типа II представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной специфичностью серин/треониновой киназы. Как правило, рецепторы типа I опосредуют внутриклеточную передачу сигнала, в то время как рецепторы типа II требуются для связывания лигандов суперсемейства TGF-бета. Рецепторы типа I и II образуют стабильный комплекс после связывания лиганда, что приводит к фосфорилированию рецепторов типа I рецепторами типа II.

Белки семейства TGF-бета могут быть подразделены на две филогенетических ветви на основе рецепторов типа I, которые они связывают, и белков Smad, которые они активируют. Одна из них является поздней сформировавшейся ветвью, которая включает, например, белки TGF-бета, активины, GDF8, GDF9, GDF11, BMP3 и nodal, которые передают сигнал через рецепторы типа I, которые активируют Smad 2 и 3 [Hinck (2012) *FEBS Letters* 586:1860-1870]. Другая ветвь включает более отдаленно родственные белки суперсемейства и включает, например, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF1, GDF5, GDF6 и GDF7, которые передают сигнал через Smad 1, 5 и 8.

Изоформы TGF-бета являются основополагающими представителями суперсемейства TGF-бета, среди которых у млекопитающих существует 3 известных изоформы, обозначаемые как TGF-бета1, TGF-бета2 и TGF-бета3. Зрелые биологически активные лиганды TGF-бета функционируют в качестве гомодимеров и в основном передают сигнал через рецептор типа I ALK5, но также было обнаружено, что они, кроме того, передают сигнал через ALK1 в эндотелиальных клетках. См., например, Goumans et al. (2003) *Mol Cell* 12(4): 817-828. TGF-бета1 является наиболее распространенной и повсеместно экспрессируемой изоформой. Известно, что TGF-бета1 играет важную роль в заживлении ран, и у мышей, у которых экспрессируется конститутивно активный трансген TGF-бета1, развивается фиброз. См., например, Clouthier

et al. (1997) *J Clin. Invest.* 100(11): 2697-2713. TGF-бета1 также вовлечен в активацию Т-клеток и поддержание регуляторных Т-клеток. См., например, Li et al. (2006) *Immunity* 25(3): 455-471. Экспрессия TGF-бета2 впервые была описана в клетках глиобластомы человека и встречается в нейронах и астроглиальных клетках эмбриональной нервной системы. Известно, что TGF-бета2 подавляет зависимый от интерлейкина-2 рост Т-лимфоцитов. TGF-бета3 первоначально был выделен из клеточной линии рабдомиосаркомы человека и после этого был обнаружен в клеточных линиях аденокарциномы легкого и карциномы почки. Известно, что TGF-бета3 является важным для морфогенеза неба и легких. См., например, Kubiczkova et al. (2012) *Journal of Translational Medicine* 10:183.

Активины являются представителями суперсемейства TGF-бета, и первоначально они были открыты в качестве регуляторов секреции фолликулостимулирующего гормона, однако впоследствии были охарактеризованы различные репродуктивные и нерепродуктивные роли. Существует три основных формы активина (А, В и АВ) которые являются гомо/гетеродимерами двух близкородственных β -субъединиц ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ и $\beta_A\beta_B$ соответственно). Геном человека также кодирует активин С и активин Е, которые в основном экспрессируются в печени, а также известны гетеродимерные формы, содержащие β_C или β_E . В суперсемействе TGF-бета активины являются уникальными и многофункциональными факторами, которые могут стимулировать продукцию гормонов в клетках яичника и плаценты, поддерживать выживаемость нейрональных клеток, положительно или отрицательно влиять нахождение клеточного цикла в зависимости от типа клеток и индуцировать мезодермальную дифференцировку по меньшей мере в эмбрионах земноводных. См., например, DePaolo et al. (1991) *Proc Soc Exp Biol Med.* 198:500-512; Dyson et al. (1997) *Curr Biol.* 7:81-84; и Woodruff (1998) *Biochem Pharmacol.* 55:953-963. В нескольких тканях антагонистом передаче сигнала активина является его родственник гетеродимер ингибин. Например, при регуляции секреции фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза активин стимулирует синтез и секрецию FSH, в то время как ингибин снижает синтез и секрецию FSH. Другие белки, которые могут регулировать биологическую активность активина и/или связываются с активином, включают фоллистатин (FS), фоллистатин-родственный белок (FSRP, также известный как FLRG или FSTL3) и α_2 -макроглобулин.

Как описано в настоящем описании, средства, которые связываются с "активином А", представляют собой средства, которые специфически связываются с субъединицей β_A , в контексте как выделенной субъединицы β_A , так и димерного комплекса (например, гомодимер $\beta_A\beta_A$ или гомодимер $\beta_A\beta_B$). В случае гетеродимерного комплекса (например, гетеродимер $\beta_A\beta_B$), средства, которые связываются с "активином А", являются специфичными к эпитопам, присутствующим в субъединице β_A , но не связываются с эпитопами, присутствующими не в субъединице β_A комплекса (например, субъединица β_B комплекса). Аналогично, средства, описанные в настоящем описании, которые являются антагонистами (ингибиторами) "активина А", представляют собой средства, которые ингибируют один или несколько видов активности, опосредуемых субъединицей β_A , в контексте как выделенной субъединицы β_A , так и димерного комплекса (например, гомодимер $\beta_A\beta_A$ или гетеродимер $\beta_A\beta_B$). В случае гетеродимеров $\beta_A\beta_B$, средства, которые ингибируют "активин А", представляют собой средства, которые специфически ингибируют один или несколько видов активности субъединицы β_A , но не ингибируют активность не субъединицы β_A комплекса (например, субъединицы β_B комплекса). Этот принцип также применим к средствам, которые связывают и/или ингибируют "активин В", "активин С" и "активин Е". Средства, описанные в настоящем описании, которые являются антагонистами "активина АВ", "активина АС", "активина АЕ", "активина ВС" или "активина ВЕ", представляют собой средства, которые ингибируют один или несколько видов активности, опосредуемых субъединицей β_A , и один или несколько видов активности, опосредуемых субъединицей β_B . Тот же принцип применим к средствам, которые связывают и/или ингибируют "активин АС", "активин АЕ", "активин ВС" или "активин ВЕ".

Белки Nodal обладают функциями в индукции и образовании мезодермы и энтодермы, а также в последующей организации осевых структур, таких как сердце и желудок, в раннем эмбриогенезе. Было продемонстрировано, что дорсальная ткань при развитии эмбрионов позвоночных вносит вклад в основном в осевые структуры ното хорды и прехордальной пластинки, и в то же время он привлекает окружающие клетки для формирования неосевых структур эмбриона. Nodal по-видимому передает сигнал через рецепторы как типа I, так и типа II, и внутриклеточные эффекторы, известные как белки SMAD. Исследования выступают в поддержку идеи, что ActRIIA и ActRIIB служат в качестве рецепторов типа II для nodal. См., например, Sakuma et al. (2002) *Genes Cells.* 2002, 7:401-12. Было предположено, что лиганды Nodal взаимодействуют с их кофакторами (например, Cripto или Cryptic), активируя рецепторы типа I и типа II активина, которые фосфорилируют SMAD2. Белки Nodal вовлечены во многие события, ключевые для раннего эмбриона позвоночных, включая образование мезодермы, переднего структурирования и специализации левой-правой оси. Экспериментальные данные продемонстрировали, что передача сигнала через nodal активирует pAR3-Lux, люциферальный репортер, который, как ранее было показано, отвечает специфически на активин и TGF-бета. Однако nodal неспособен индуцировать pTlx2-Lux, репортер, специфически отвечающий на костные морфогенетические белки. Последние результаты обеспечивают прямые биохимические доказательства того, что передача сигнала nodal опосредуется SMAD2

и SMAD3, которые также опосредуют передачу сигнала через белки TGF-бета и активины. Кроме того, данные показали, что для передачи сигнала *nodal* требуется внутриклеточный белок *Cripto* или *Styptic*, что отличает его от передачи сигнала активина или TGF-бета.

Белки BMP и белки GDF вместе составляют семейство цитокинов с цистеиновым узлом, имеющим характерную укладку суперсемейства TGF-бета. См., например, Rider et al. (2010) *Biochem J.*, 429(1):1-12. Это семейств включает, например, BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP2a, BMP3, BMP3b (также известен как GDF10), BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP8a, BMP8b, BMP9 (также известен как GDF2), BMP10, BMP11 (также известен как GDF11), BMP12 (также известен как GDF7), BMP13 (также известен как GDF6), BMP14 (также известен как GDF5), BMP15, GDF1, GDF3 (также известен как VGR2), GDF8 (также известен как миостатин), GDF9, GDF15 и декапентаплегический фактор. Помимо способности индуцировать образование кости, которая дала белкам BMP их название, BMP/GDF проявляют морфогенетическую активность при развитии широкого диапазона тканей. Гомодимеры и гетеродимеры BMP/GDF взаимодействуют с комбинациями димеров рецепторов типа I и типа II, образуя множество возможных передающих сигнал комплексов, что приводит к активации одного из двух конкурирующих наборов факторов транскрипции SMAD. Белки BMP/GDF обладают высокоспецифическими и локализованными функциями. Они регулируются рядом путей, включая обусловленное стадией развития ограничение экспрессии BMP/GDF и секрецию нескольких специфических белков-антагонистов BMP, которые связываются с цитокинами с высокой аффинностью. Интересно, что ряд этих антагонистов сходны с лигандами суперсемейства TGF-бета.

Фактор роста и дифференцировки 8 (GDF8) также известен как миостатин. GDF8 является отрицательным регулятором скелетной мышечной массы и на высоком уровне экспрессируется в развивающихся и взрослых скелетных мышцах. Нуль-мутация GDF8 у трансгенных мышей характеризуется выраженной гипертрофией и гиперплазией скелетных мышц. См., например, McPherron et al., *Nature* (1997) 387:83-90. Сходное повышение скелетной мышечной массы является очевидным при встречающихся в природе мутациях GDF8 у крупного рогатого скота и, неожиданно, у человека. См., например, Ashmore et al. (1974) *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci.* (1994) 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:12457-12461; Kambadur et al., *Genome Res.* (1997) 7:910-915; и Schuelke et al. (2004) *N Engl J Med*, 350:2682-8. В исследованиях было показано, что потеря мышечной массы, обусловленная ВИЧ-инфекцией у человека, сопровождается повышением экспрессии белка GDF8. См., например, Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS* (1998) 95:14938-43. Кроме того, GDF8 может модулировать продукцию специфических ферментов мышц (например, креатинкиназа) и модулировать пролиферацию миобластных клеток. См., например, публикацию международной патентной заявки № WO 00/43781). Пропептид GDF8 может нековалентно связываться со зрелым димером домена GDF8, инактивируя его биологическую активность. См., например, Miyazono et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263; 7646-7654; и Brown et al. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43. Другие белки, которые связываются с GDF8 или структурно родственными белками и ингибируют их биологическую активность, включают фоллистатин и потенциально фоллистатин-родственные белки. См., например, Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232.

GDF11, также известный как BMP11, представляет собой секретлируемый белок, который экспрессируется в хвостовой почке, зачатке конечности, дугах верхней и нижней челюстей и дорсальных корешковых ганглиях в ходе развития мышей. См., например, McPherron et al. (1999) *Nat. Genet.*, 22: 260-264; и Nakashima et al. (1999) *Mech. Dev.*, 80: 185-189. GDF11 играет уникальную роль в структурировании как мезодермальных, так и нервных тканей. См., например, Gamer et al. (1999) *Dev Biol.*, 208:222-32. Было показано, что GDF11 является отрицательным регулятором хондрогенеза и миогенеза при развитии конечностей курицы. См., например, Gamer et al. (2001) *Dev Biol.*, 229:407-20. Экспрессия GDF11 в мышцах также указывает на его роль в регуляции роста мышц аналогично GDF8. Кроме того, экспрессия GDF11 в головном мозге указывает на то, что GDF11 также может обладать активностью, которая связана с функцией нервной системой. Интересно, что было обнаружено, что GDF11 ингибирует нейрогенез в обонятельном эпителии. См., например, Wu et al. (2003) *Neuron.*, 37:197-207. Таким образом, GDF11 может обладать применением *in vitro* и *in vivo* при лечении заболеваний, таких как мышечные заболевания и нейродегенеративные заболевания (например, боковой амиотрофический склероз).

Хорошо известно, что BMP7, также называемый остеогенным белком 1 (OP-1), индуцирует образование хрящей и костей. Кроме того, BMP7 регулирует широкий спектр физиологических процессов. Например, BMP7 может быть остеоиндуктивным фактором, ответственным за феномен эпителиального остеогенеза. Также было обнаружено, что BMP7 играет роль в регуляции кальция и костном гомеостазе. Подобно активину, BMP7 связывается с рецепторами типа II, ActRIIA и ActRIIB. Однако BMP7 и активин привлекают разные рецепторы типа I в гетеромерные рецепторные комплексы. Основным выявленным рецептором BMP7 типа I является ALK2, в то время как активин связывался исключительно с ALK4 (ActRIIB). BMP7 и активин индуцируют различные биологические ответы и активируют различные каскады SMAD. См., например, Macias-Silva et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:25628-36.

Антимюллеров гормон (АМН), также известный как мюллерова ингибирующая субстанция (MIS), представляет собой гликопротеин семейства TGF-бета. Был идентифицирован один ассоциированный с

AMH рецептор типа II, и его обозначают как AMHRII, или альтернативно MISRII. AMH индуцирует регрессию муллеровых протоков у мужских эмбрионов человека. AMH экспрессируется у женщин репродуктивного возраста и не имеет колебаний в цикле или при беременности, однако было обнаружено, что его уровень постепенно снижается по мере снижения как количества, так и качества ооцитов, что указывает на то, что AMH может выступать в качестве биомаркера физиологии яичников. См. например Zec et al. (2011) *Biochemia Medica* 21(3): 219-30.

Подобная рецептору активина киназа-1 (ALK1), продукт гена *ACVRL1*, альтернативно известный как *ACVRLK1*, представляет собой рецептор типа I, экспрессия которого в основном ограничивается эндотелиальными клетками. См., например, запись OMIM 601284. ALK1 активируется посредством связывания лигандов семейства TGF-бета, таких как BMP9 и BMP10, и передача сигнала ALK1 является ключевой при регуляции как обусловленного развитием, так и патологического образования кровеносных сосудов. Экспрессия ALK1 перекрывается с областями васкулогенеза и ангиогенеза при раннем развитии мышей и мыши с нокаутом ALK1 погибают приблизительно на сутки 11,5 эмбрионального развития вследствие тяжелых сосудистых аномалий (см., например, Cunha and Pietras (2011) *Blood* 117(26):6999-7006.) Экспрессия ALK1 также описана в других типах клеток, таких как звездчатые клетки печени и хондроциты. Кроме того, было обнаружено, что ALK1 вместе с подобной рецептору активина киназой 2 (ALK2) является важной для индуцируемой BMP9 остеогенной передачи сигнала в мезенхимных стволовых клетках. См., например, Cunha and Pietras (2011) *Blood* 117(26):6999-7006.

ALK2, продукт гена *ACVR1*, альтернативно известный как *ActRIA* или *ACVRLK2*, представляет собой рецептор типа I, который, как было показано, связывает активины и белки BMP. ALK2 является ключевым для эмбриогенеза, поскольку мыши с нокаутом ALK2 погибают вскоре после гастрюляции. См., например, Mishina et al. (1999) *Dev Biol.* 213: 314-326 и запись OMIM 102576. Конститутивно активные мутации в ALK2 ассоциированы с прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазией (FOP). FOP представляет собой редкое генетическое нарушение, которое включает оссификацию фиброзной ткани, в том числе мышц, сухожилий и связок, спонтанно или при повреждении. Мутация аргинина на гистидин в кодоне 206 ALK2 представляет собой естественную мутацию, ассоциированную с FOP у человека. Эта мутация индуцирует BMP-специфическую передачу сигнала через ALK2 без связывания лиганда. См., например, Fukuda et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 284 (11): 7149-7156 и Kaplan et al. (2011) *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1237: 5-10.

Подобная рецептору активина киназа-3 (ALK3), продукт гена *BMPRI1A*, альтернативно известный как *ACVRLK3*, представляет собой рецептор типа I, опосредующий эффекты множества лигандов семейства BMP. В отличие от нескольких рецепторов типа I с повсеместной экспрессией в тканях, ALK3 демонстрирует ограниченный паттерн экспрессии, согласующийся с более специализированной функциональностью. См., например, ten Dijke (1993) *Oncogene*, 8: 2879-2887 и запись OMIM 601299. ALK3 общепризнана в качестве высокоаффинного рецептора для BMP2, BMP4, BMP7 и других представителей семейства BMP. BMP2 и BMP7 являются мощными стимуляторами дифференцировки остеобластов, и в настоящее время их используют в клинике для индукции образования костей при спондилодезе и определенных несрастающих переломах. ALK3 считается ключевым рецептором, опосредующим передачу сигнала BMP2 и BMP4 в остеобластах. См., например, Lavery et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 20948-20958. Гомозиготные мыши с нокаутом ALK3 погибают на ранней стадии эмбриогенеза (~9,5 сутки), однако недавно было описано, что взрослые мыши, имеющие зависимое от условий нарушение ALK3 в остеобластах, демонстрируют увеличенную костную массу, хотя вновь образованная кость демонстрировала признаки дезорганизации. См., например, Kamiya (2008) *J. Bone Miner. Res.*, 23:2007-2017; и Kamiya (2008) *Development* 135: 3801-3811. Эти данные удивительно противоположны эффективности BMP2 и BMP7 (лиганды для ALK3) в качестве средств для формирования костей в клиническом применении.

Подобная рецептору активина киназа-4 (ALK4), продукт гена *ACVR1B*, альтернативно известный как *ACVRLK4*, представляет собой рецептор типа I, который передает сигнал для ряда лигандов семейства TGF-бета, включая активины, *nodal* и GDF. Мутации в ALK4 ассоциированы с раком поджелудочной железы и доминантно-негативные укороченные изоформы ALK4 экспрессируются на высоком уровне в опухолях гипофиза человека. См., например, Tsuchida et al. (2008) *Endocrine Journal* 55(1):11-21 и запись OMIM 601300.

Подобная рецептору активина киназа-5 (ALK5), продукт гена *TGFBR1*, широко экспрессируется в большинстве типов клеток. Несколько лигандов суперсемейства TGF-бета, включая белки TGF-бета, активин и GDF-8, передают сигнал через ALK5 и активируют нижерасположенные Smad 2 и Smad 3. Мыши с дефицитом ALK5 имеют тяжелые дефекты развития сосудов желточного мешка и плаценты, не имеют циркулирующих эритроцитов и погибают в середине гестации. Было обнаружено, что эти эмбрионы имеют нормальный гемопоэтический потенциал, но усиленную пролиферацию и ненадлежащую миграцию эндотелиальных клеток. Таким образом, зависимость от ALK5 передача сигнала является важной для ангиогенеза, но не для развития гемопоэтических клеток-предшественников и функционального гемопоэза. См., например, Larsson et al. (2001) *The EMBO Journal*, 20(7): 1663-1673 и запись OMIM 190181. В эндотелиальных клетках ALK5 действует кооперативно и противоположно передаче сигнала ALK1. ALK5 ингибирует миграцию и пролиферацию клеток, что, примечательно, является противопо-

ложным эффектом ALK1. См., например, Goumans et al. (2003) *Mol Cell* 12(4):817-828. Кроме того, полагают, что ALK5 подавляет рост мышц. Было обнаружено, что нокдаун ALK5 в мышцах в модели на мышцах мышечной дистрофии снижает фиброз и повышает экспрессию генов, ассоциированных с ростом мышц. См., например, Kemaladewi et al. (2014) *Mol Ther Nucleic Acids* 3, e156.

Подобная рецептору активина киназа-6 (ALK6) является продуктом гена *BMPR1B*, дефицит которого ассоциирован с хондродисплазией и дефектами конечностей как у человека, так и у мышей. См., например, Demirhan et al. (2005) *J Med Genet.* 42:314-317. ALK6 широко экспрессируется в развивающемся скелете и требуется для хондрогенеза у мышей. См., например, Yi et al. (2000) *Development* 127:621-630 и запись OMIM 603248.

Подобная рецептору активина киназа-7 (ALK7) является продуктом гена *ACVR1C*. Мыши с нулевой мутацией ALK7 являются жизнеспособными, фертильными и не демонстрируют дефектов скелета или конечностей. Передача сигнала GDF3 через ALK7 по-видимому играет роль в чувствительности к инсулину и ожирении. Это подтверждается результатами, согласно которым мыши с нулевой мутацией *Alk7* демонстрируют сниженное накопление жиров и резистентность к индуцированному рационом ожирению. См., например, Andersson et al. (2008) *PNAS* 105(20): 7252-7256. Опосредуемая ALK7 передача сигнала Nodal вовлечена как в стимулирующие опухоль, так и в подавляющие опухоль эффекты в множестве различных злокачественных клеточных линий. См., например, De Silva et al. (2012) *Frontiers in Endocrinology* 3:59 и запись OMIM 608981.

Как используют в рамках изобретения, термин "ActRII" относится к семейству рецепторов активина типа II. Это семейство включает как рецептор активина типа IIA (*ActRIIA*), кодируемый геном *ACVR2A*, так и рецептор активина типа IIB (*ActRIIB*), кодируемый геном *ACVR2B*. Рецепторы ActRII представляют собой рецепторы типа II белков суперсемейства, которые связывают различные лиганды суперсемейства TGF-бета, включая активины, GDF8 (миостатин), GDF11 и подгруппу BMP, особенно BMP6 и BMP7. Рецепторы ActRII вовлечены в различные биологические нарушения, включая мышечные и нервно-мышечные нарушения (например, мышечная дистрофия, боковой амиотрофический склероз (ALS) и мышечная атрофия), нежелательный рост костей/хрящей, нарушения жировой ткани (например, ожирение), метаболические нарушения (например, диабет 2 типа) и нейродегенеративные нарушения. См., например, Tsuchida et al. (2008) *Endocrine Journal* 55(1):11-21, Knopf et al., U.S.8252900 и записи OMIM 102581 и 602730.

Рецептор II трансформирующего фактора роста-бета (TGFBR2), кодируемый геном *TGFBR2*, представляет собой рецептор типа II, о котором известно, что он связывает лиганды TGF-бета и активирует нижерасположенные эффекторы Smad 2 и Smad 3. См., например, Hinck (2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870 и запись OMIM 190182. Передача сигнала TGF-бета через TGFBR2 является критически важной при пролиферации T-клеток, в поддержании регуляторных T-клеток и пролиферации прехрящевых стволовых клеток. См., например, Li et al. (2006) *Immunity* 25(3): 455-471 и Cheng et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 12665-12676.

Рецептор костного морфогенетического белка II (*BMPR2*), кодируемый геном *BMPR2*, представляет собой рецептор типа II, который, как полагают, связывает определенные лиганды BMP. В некоторых случаях эффективное связывание лиганда с *BMPR2* зависит от присутствия соответствующих рецепторов TGFBR типа I. См., например, Rosenzweig et al. (1995) *PNAS* 92:7632-7636. Мутации в *BMPR2* ассоциированы с легочной гипертензией у человека. См. запись OMIM 600799.

Рецептор II мюллеровой ингибирующей субстанции (*MISR2*), продукт гена *AMHR2*, альтернативно известный как рецептор типа II антимюллерова гормона, представляет собой рецептор типа II TGF-бета. *MISR2* связывает лиганд MIS, но требует присутствия соответствующего рецептора типа I, такого как ALK3 или ALK6, для передачи сигнала. См., например, Hinck (2012) *FEBS Letters* 586:1860-1870 и запись OMIM 600956. *MISR2* вовлечен в половую дифференцировку у человека и требуется для регрессии мюллерова канала у мужчин. AMH экспрессируется у женщин репродуктивного возраста и не имеет колебаний в цикле или при беременности, однако было обнаружено, что его уровень постепенно снижается по мере снижения как количества, так и качества ооцитов, что указывает на то, что AMH может выступать в качестве биомаркера физиологии яичников. См., например, Zec et al. (2011) *Biochemia Medica* 21(3): 219-30 и запись OMIM 600956.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению а) гетеромультимерных комплексов, содержащих внеклеточный домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGFβ (например, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7) и внеклеточный домен полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGFβ (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBR2, *BMPR2* и *MISR2*), б) гетеромультимерных комплексов, содержащих внеклеточный домен по меньшей мере двух полипептидов рецепторов типа I суперсемейства TGFβ (например, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7), и гетеромультимерных комплексов, содержащих внеклеточный домен по меньшей мере двух полипептидов рецепторов типа II суперсемейства TGFβ (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBR2, *BMPR2* и *MISR2*), предпочтительно растворимых гетеромультимерных комплексов, для антагонизма внутриклеточной передаче сигнала (например, передаче сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8), запускаемой одним

или несколькими лигандами суперсемейства TGF β (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, мюллерова ингибирующая субстанция (MIS) и Lefty). Как описано в настоящем описании, такие гетеромультимерные комплексы-антагонисты могут быть пригодными для лечения или предупреждения различных нарушений/состояний, ассоциированных, например, со снижением мышечной массы, недостаточным ростом мышц, нейродегенерацией, снижением костной массы, сниженной плотностью и/или минерализацией костей, недостаточным ростом костей, метаболическими нарушениями, такими как ожирение и нарушения эритроцитов, такие как.

В частности, данные по настоящему изобретению демонстрируют, что гетеромультимерные комплексы, содержащие внеклеточный домен полипептида рецептора типа I суперсемейства TGF β и внеклеточный домен полипептида рецептора типа II суперсемейства TGF β обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами.

Термины, используемые в настоящем описании, обычно имеют их обычное общепринятое значение в данной области в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, в котором используют каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других частях описания для представления дополнительного руководства практикующему специалисту при описании композиций и способов по изобретению, и их получения и применения. Объем или значение при любом использовании термина станет очевидным из конкретного контекста, в котором его используют.

Термины "гетеромер" или "гетеромультимер" относятся к комплексу, содержащему по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид, где аминокислотная последовательность второго полипептида отличается от аминокислотной последовательности первого полипептида по меньшей мере одним аминокислотным остатком. Гетеромер может включать "гетеродимер", образованный первым и вторым полипептидом, или может образовывать структуры более высокого порядка, где присутствуют полипептиды помимо первого и второго полипептидов. Иллюстративные структуры гетеромультимера включают гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. Гетеродимеры обозначают в настоящем описании как X:Y или эквивалентно как X-Y, где X обозначает первый полипептид и Y обозначает второй полипептид. Гетеромеры более высокого порядка и олигомерные структуры обозначают в настоящем описании соответствующим образом. В определенных вариантах осуществления гетеромультимер является рекомбинантным (например, один или несколько полипептидных компонентов могут представлять собой рекомбинантный белок), выделенным и/или очищенным.

"Гомологичный" во всех его грамматических формах и вариантах произношения относится к взаимосвязи между двумя белками, которые обладают "общим эволюционным происхождением", включая белки суперсемейств одного и того же вида организмов, а также гомологичные белки из различных видов организмов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) обладают гомологией последовательностей, которая отражается их сходством последовательностей, с точки зрения как процентной идентичности, так и присутствия конкретных остатков или мотивов и консервативных положений. Однако обычно и в настоящем патенте термин "гомологичный", определенный наречием, таким как "высоко", может относиться к сходству последовательностей или может быть связан или может не быть связан с общим эволюционным происхождением.

Термин "сходство последовательностей" во всех его грамматических формах относится к степени идентичности или соответствия между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями, которые могут иметь или могут не иметь общее эволюционное происхождение.

"Процентную (%) идентичность последовательностей" относительно эталонной полипептидной (или нуклеотидной) последовательности определяют как процент аминокислотных остатков (или нуклеиновых кислот) в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам (или нуклеиновым кислотам) в эталонной полипептидной (нуклеотидной) последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен в качестве идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными способами данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, требуемые для достижения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величины % идентичности аминокислотных последовательностей (последовательностей нуклеиновых кислот) получают с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторство компью-

терной программы сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит Genentech, Inc. и исходный код был предоставлен вместе с пользовательской документацией в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под номером регистрации авторского права в США № TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной от Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., или может быть составлена из исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть составлена для использования на операционной системе UNIX, включая Digital UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

"Являться агонистом" во всех его грамматических формах относится к процессу активации белка и/или гена (например, посредством активации или амплификации экспрессии гена этого белка или индукции вхождения неактивного белка в активное состояние) или повышения активности белка и/или гена.

"Являться антагонистом" во всех его грамматических формах относится к процессу ингибирования белка и/или гена (например, посредством ингибирования или снижения экспрессии гена этого белка или посредством индукции вхождения активным белком в неактивное состояние) или снижения активности белка и/или гена.

Как используют в рамках изобретения, если нет иных указаний, "по существу не связывается с X" означает, что средство имеет K_D более чем приблизительно 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} или более (например, не поддающееся обнаружению связывание в анализе, используемом для определения K_D) в отношении "X", где "X" представляет собой конкретный агент, такой как белок или нуклеиновая кислота.

Термины "приблизительно" и "около", используемые применительно к числовой величине на протяжении описания и формулы изобретения, обозначает интервал точности, известный и приемлемый для специалиста в данной области. Как правило, такой интервал точности составляет $\pm 10\%$. Альтернативно и конкретно в биологических системах, термины "приблизительно" и "около" могут означать величины, которые находятся в пределах порядка величины предпочтительно в ≤ 5 раз и более предпочтительно в ≤ 2 раз относительно данной величины.

Числовые диапазоны, описанные в настоящем описании, являются включающими числа, определяющие диапазоны.

Форма единственного числа включает множественное число объектов, если контекст, в котором используется эта форма, явно не указывает на иное. Форма единственного числа, а также термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо. Более того, "и/или", когда его используют в настоящем описании, следует понимать как конкретное описание каждого из двух или более указанных признаков или компонентов совместно с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", как используют в выражении, таком как "А и/или В" в настоящем описании, включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, термин "и/или", как используют в выражении, такой как "А, В и/или С" охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

На протяжении настоящего описания слово "содержать" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий" следует понимать как включающие указанное целое число или группы чисел, но не исключающие любое другое число или группы чисел.

2. Комплексы рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, содержащим один или несколько полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, белки ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7 человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476) и один или несколько полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, белки ActRIIA, ActRIIB, TGFBR1, BMPRII и MISRII человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462); к гетеромультимерным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, белки ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7 человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476); и к гетеромультимерным комплексам, содержащим по меньшей мере два различных поли-

пептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, белки ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII человека или другого вида, такого как виды, описанные в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462), которые как правило обозначают в настоящем описании как "гетеромультимерные комплексы" или "гетеромультимеры". Предпочтительно гетеромультимеры являются растворимыми, например, гетеромультимер содержит растворимую часть по меньшей мере одного полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF β и растворимую часть (домен) по меньшей мере одного полипептида рецептора типа II суперсемейства TGF β . Как правило, внеклеточные домены рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF β соответствуют растворимой части рецептора типа I и типа II. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат внеклеточный домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF β (например, один или несколько внеклеточных доменов рецепторов ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и/или ALK7) и/или внеклеточный домен полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF β (например, один или несколько внеклеточных доменов рецепторов ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и/или MISRII). Иллюстративные внеклеточные домены ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6, ALK7, ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII описаны в настоящем описании, и такие последовательности, а также их фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы можно использовать в соответствии с настоящим изобретением (например, композиции гетеромультимеров и их применения). Гетеромультимеры по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и олигомерные структуры более высокого порядка. См., например, фиг. 1, 2 и 15-17. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению представляют собой гетеродимеры.

Определяющий структурный мотив, известный как укладка токсина с тремя пальцами, является важным для связывания лигандов рецепторами типа I и типа II, и он образован 10, 12 или 14 консервативными остатками цистеина, расположенными в различных положениях во внеклеточном домене каждого мономерного рецептора. См., например, Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870. Центральные лиганд-связывающие домены рецепторов белков суперсемейства TGF β , ограничиваемые крайними из этих консервативных остатков цистеина, соответствуют положениям 29-109 SEQ ID NO: 1 (предшественник ActRIIB); положениям 30-110 SEQ ID NO: 9 (предшественник ActRIIA); положениям 34-95 SEQ ID NO: 14 (предшественник ALK1); положениям 35-99 SEQ ID NO: 18 (предшественник ALK2); положениям 61-130 SEQ ID NO: 22 (предшественник ALK3); положениям 34-101 SEQ ID NO: 26 и 83 (предшественники ALK4); положениям 36-106 SEQ ID NO: 30 и 87 (предшественники ALK5); положениям 32-102 SEQ ID NO: 34 (предшественник ALK6 изоформы B); положениям 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 и 309 (предшественники ALK7); положениям 51-143 SEQ ID NO: 42 (предшественник TGFBRII изоформы B); положениям 34-123 SEQ ID NO: 46 и 71 (предшественники BMPRII); положениям 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 и 79 (предшественники MISRII); положениям 44-168 SEQ ID NO: 67 (предшественник TGFBRII изоформы A) и положениям 62-132 SEQ ID NO: 91 (предшественник ALK6 изоформы A). Структурно менее упорядоченные аминокислоты, фланкирующие эти ограничиваемые цистеином центральные последовательности, могут быть укорочены на 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, 34, 35, 36 или 37 остатков на любом из концов без обязательного изменения связывания лиганда. Иллюстративные внеклеточные домены N-концевого и/или C-концевого укорочения включают SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 10, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 302, 306, 310 и 313.

В предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета, включая, но не ограничиваясь ими, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин A, активин B, активин C, активин E, активин AB, активин AC, активин AE, активин BC, активин BE, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty. В частности, гетеромультимерные комплексы по изобретению можно использовать для антагонизма передаче сигнала (например, передаче сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8), запускаемой одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF β , что можно определять, например, с использованием клеточного анализа, такого как клеточные анализы, описанные в настоящем описании. Как описано в настоящем описании, такие гетеромультимерные комплексы-антагонисты могут использоваться для лечения или предупреждения различных нарушений/состояний, ассоциированных, например, со снижением мышечной массы, недостаточным ростом мышц, нейродегенерацией, потерей костной массы, снижением плотности и/или минерализации костей, недостаточным ростом костей и/или ожирением. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующим гомомультимерным комплексом (например, гетеродимер

ALK4:ActRIIB против соответствующего гомодимера ActRIIB или ALK4).

Как используют в рамках изобретения, термин "ActRIIB" относится к семейству белков рецепторов активина типа IIB (ActRIIB) любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ActRIIB посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ActRIIB в настоящем описании следует понимать как указание на любую из в настоящее время идентифицированных форм. Представители семейства ActRIIB, как правило, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена, содержащего цистеин-богатую область, трансмембранный домен и цитоплазматический домен со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ActRIIB" включает полипептиды, включающие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ActRIIB, а также любых его вариантов (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Примеры таких полипептидов вариантов ActRIIB представлены в настоящем описании, а также в публикациях международных патентных заявок № WO 2006/012627, WO 2008/097541 и WO 2010/151426, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Нумерация аминокислот для всех родственных ActRIIB полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ActRIIB человека, представленного ниже (SEQ ID NO: 1), если нет иных конкретных обозначений.

Последовательность белка-предшественника ActRIIB человека является следующей:

```

1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLGERCE
51  GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
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 MLPFEEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием; внеклеточный домен указан полужирным шрифтом; и потенциальные эндогенные участки N-связанного гликозилирования указаны двойным подчеркиванием.

Процессирующая (зрелая) внеклеточная последовательность полипептида ActRIIB является следующей:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID
NO: 2) .

```

В некоторых вариантах осуществления белок может продуцироваться с последовательностью "SGR..." на N-конце. С-концевая "хвостовая часть" внеклеточного домена указана однократным подчеркиванием. Последовательность с делетированной "хвостовой частью" (последовательность Δ15) является следующей:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3) .

```

Также в литературе описана форма ActRIIB с остатком аланина в положении 64 SEQ ID NO: 1 (A64). См., например, Hilden et al. (1994) Blood, 83(8): 2163-2170. Заявители установили, что слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий внеклеточный домен ActRIIB с заменой A64, обладает относительно низкой аффинностью в отношении активина и GDF11. Напротив, тот же слитый белок ActRIIB-Fc с аргинином в положении 64 (R64) обладает аффинностью в отношении активина и GDF11 в диапазоне от низкого наномолярного до высокого пикомолярного. Таким образом, в рамках настоящего изобретения последовательности с R64 используют в качестве эталонной последовательности "дикого типа" для ActRIIB человека.

Форма ActRIIB с аланином в положении 64 является следующей:

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
 51 GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
 101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLPIGGLS
 151 LIVLLAFWY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFTAA
 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYKGN IITWNECHV AETMSRGLSY
 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
 401 KAADGPFVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPL
 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 4)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Процессированная (зрелая) последовательность внеклеточного полипептида ActRIIB альтернативной формы А64 является следующей:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCW
LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID
 NO: 5)

В некоторых вариантах осуществления белок может продуцироваться с последовательностью "SGR..." на N-конце. С-концевая "хвостовая часть" внеклеточного домена указана однократным подчеркиванием. Последовательность с делетированной "хвостовой частью" (последовательность Δ15) является следующей:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCW
LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 6)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник ActRIIB человека, показана ниже (SEQ ID NO: 7), и соответствует нуклеотидам 25-1560 справочной последовательности Genbank NM 001106.3, которые кодируют аминокислоты 1-513 предшественника ActRIIB. В показанной последовательности в положении 64 находится аргинин, но вместо этого, она может быть модифицирована так, чтобы в этом положении находился аланин. Сигнальная последовательность подчеркнута.

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 CTCTGCAAC GAAGGCTTCA CTCATTTGCC
 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCG ACAGCCCCCA
 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC
 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA
 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
 551 TGTTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
 601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGTGTCG
 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
 851 GGAACGAACT GTGTATGTA GCAGAGACGA TGTACAGAGG CCTCTCATAC
 901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
 951 TGCCACAGG 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 TTGGTGTCTG GGGAGCTTGT GTCTCGTGC
 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTGAAACA CCCGGGCCTG
 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTCCCTGGT GACCTCTGTC
 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая процессированный внеклеточный полипептид ActRIIB человека, является следующей (SEQ ID NO: 8). В показанной последовательности в положении 64 находится аргинин, но вместо этого, она может быть модифицирована так, чтобы в этом положении находился аланин.

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACCTG
 51 GGAGCTGGAG CGCACCACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC
 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
 (SEQ ID NO: 8)

Выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточного домена ActRIIB человека и внеклеточного домена ActRIIA человека проиллюстрировано на фиг. 3. На этом выравнивании указаны аминокислотные остатки в обоих рецепторах, которые предположительно прямо контактируют с лигандами ActRII. Например, составные структуры ActRII показали, что лиганд-связывающий карман ActRIIB определяется, частично, остатками Y31, N33, N35, L38-T41, E47, E50, Q53-K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78-N83, Y85, R87, A92 и E94-F101. Ожидается, что в этих положениях допустимы консервативные мутации.

Кроме того, ActRIIB является высококонсервативным у позвоночных с большими полностью консервативными участками внеклеточного домена. Например, на фиг. 4 представлено множественное выравнивание внеклеточного домена ActRIIB человека по сравнению с различными ортологами ActRIIB.

Многие из лигандов, которые связываются с ActRIIB, также являются высококонсервативными. Таким образом, из этого выравнивания можно спрогнозировать ключевые аминокислотные положения в лиганд-связывающем домене, которые являются важными для нормальной активности ActRIIB в отношении связывания лиганда, а также спрогнозировать аминокислотные положения, в которых, вероятно, будет допустима замена без значительного изменения нормальной активности ActRIIB в отношении связывания лиганда. Таким образом, активный вариант полипептида ActRIIB человека, пригодный в соответствии с описанными в настоящем описании способами, может включать одну или несколько аминокислот в соответствующих положениях последовательности ActRIIB другого позвоночного, или может включать остаток, который является сходным с остатком в последовательностях человека или другого позвоночного. Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют этот подход для определения активного варианта ActRIIB. L46 во внеклеточном домене человека (SEQ ID NO: 2) представляет собой валин в ActRIIB Xenopus (SEQ ID NO: 505), и, таким образом, это положение может быть изменено, и необязательно оно может быть изменено на другой гидрофобный остаток, такой как V, I или F, или неполярный остаток, такой как A. E52 во внеклеточном домене человека представляет собой K у Xenopus, что указывает на то, что в этом участке может быть допустимым широкое множество изменений, включая полярные остатки, такие как E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y и возможно A. T93 во внеклеточном домене человека представляет собой K у Xenopus, что указывает на то, что в этом положении допустимо широкое структурное варьирование, причем предпочтительными являются полярные остатки, такие как S, K, R, E, D, H, G, P, G и Y. F108 во внеклеточном домене человека представляет собой Y у Xenopus, и, таким образом, должны быть допустимыми Y или другая гидрофобная группа, такая как I, V или L. E111 во внеклеточном домене человека представляет собой K у Xenopus, что указывает на то, что в этом положении допустимы заряженные остатки, включая D, R, K и H, а также Q и N. R112 во внеклеточном домене человека представляет собой K у Xenopus, что указывает на то, что в этом положении допустимы основные остатки, включая R и H. A в положении 119 во внеклеточном домене человека является относительно мало консервативен, и представляет собой P у грызунов и V у Xenopus, таким образом, в этом положении допустима практически любая аминокислота.

Более того, белки ActRII охарактеризованы в данной области с точки зрения структурных и функциональных характеристик, в частности, в отношении связывания лиганда [Attisano et al. (1992), Cell 68(1):97-108; Greenwald et al. (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allendorph et al. (2006) PNAS 103(20): 7643-7648; Thompson et al. (2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566; а также патенты США №: 7709605, 7612041 и 7842663]. В дополнение к указаниям в настоящем описании, в этих ссылках предоставлено подробное руководство по получению вариантов ActRIIB, которые сохраняют один или несколько видов активности (например, активность связывания лиганда).

Например, определяющий структурный мотив, известный как укладка токсина с тремя пальцами, является важным для связывания лигандов рецепторами типа I и типа II, и он образован консервативными остатками цистеина, расположенными в различных положениях во внеклеточном домене каждого мономерного рецептора [Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; и Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. Таким образом, центральные лиганд-связывающие домены ActRIIB человека, ограничивающиеся крайними из этих консервативных остатков цистеина, соответствуют положениям 29-109 SEQ ID NO: 1 (предшественник ActRIIB). Таким образом, структурно менее упорядоченные аминокислоты, фланкирующие эти ограничиваемые цистеином центральные последовательности, могут быть укорочены приблизительно на 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 или 28 остатков на N-конце и/или приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 остатков на C-конце без необходимого изменения связывания лиганда. Иллюстративные внеклеточные домены ActRIIB для N-концевого и/или C-концевого укорочения включают SEQ ID NO: 2, 3, 5 и 6.

Attisano et al. продемонстрировали, что делеция пролинового узла на C-конце внеклеточного домена ActRIIB снижала аффинность рецептора к активину. Слитый белок ActRIIB-, содержащий аминокислоты 20-119 SEQ ID NO: 1 настоящей заявки, "ActRIIB(20-119)-Fc", имеет сниженное связывание с GDF11 и активинном относительно ActRIIB(20-134)-Fc, который включает область пролинового узла и полный околочембранный домен (см., например, патент США № 7842663). Однако белок ActRIIB (20-129)-Fc сохраняет сходную, однако в некоторой степени сниженную активность относительно белка дикого типа, даже несмотря на то, что область пролинового узла нарушена.

Таким образом, ожидается, что все внеклеточные домены ActRIIB, которые оканчиваются аминокислотой 134, 133, 132, 131, 130 и 129 (относительно SEQ ID NO: 1) будут активными, однако конструкции, оканчивающиеся аминокислотой 134 или 133, могут быть наиболее активными. Аналогично, ожидается, что мутации в любых из остатков 129-134 (относительно SEQ ID NO: 1) не изменят аффинности связывания лиганда в значительной степени. В подтверждение этого, в данной области известно, что мутации P129 и P130 (относительно SEQ ID NO: 1) по существу не снижают связывания лиганда. Таким образом, полипептид ActRIIB по настоящему изобретению может оканчиваться уже аминокислотой 109 (конечный остаток цистеина), однако ожидается, что формы, оканчивающиеся на или между 109 и 119 (например, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 или 119), будут иметь сниженное связывание

лиганда. Аминокислота 119 (относительно SEQ ID NO: 1 настоящей заявки) является мало консервативной и, таким образом, ее может без труда изменить или включить в укорочение. Полипептиды ActRIIB, оканчивающиеся аминокислотой 128 (относительно SEQ ID NO: 1) или далее, должны сохранять активность связывания лиганда. Полипептиды ActRIIB, оканчивающиеся на или между 119 и 127 (например, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 или 127) относительно SEQ ID NO: 1 будут иметь промежуточную связывающую способность. Может быть желательным использование любой из этих форм в зависимости от клинических или экспериментальных условий.

Ожидается, что на N-конце ActRIIB белок, начинающийся на аминокислоте 29 или ранее (относительно SEQ ID NO: 1) будет сохранять активность связывания лиганда. Аминокислота 29 соответствует начальному остатку цистеина. Мутация аланина на аспарагин в положении 24 (относительно SEQ ID NO: 1) вносит последовательность N-связанного гликозилирования по существу без влияния на связывание лиганда [патент США № 7842663]. Это подтверждает, что мутации в области между сигнальным отщепляемым пептидом и сшитой цистеином областью, соответствующей аминокислотам 20-29, является допустимой. В частности, полипептиды ActRIIB, начинающиеся в положениях 20, 21, 22, 23 и 24 (относительно SEQ ID NO: 1) должны сохранять общую активность связывания лиганда, и также ожидается, что полипептиды ActRIIB, начинающиеся в положениях 25, 26, 27, 28 и 29 (относительно SEQ ID NO: 1) будут сохранять активность связывания лиганда. Было продемонстрировано, например, в патенте США № 7842663, что, неожиданно, конструкция ActRIIB, начинающаяся в положении 22, 23, 24 или 25, будет иметь наибольшую активность.

В совокупности, общая формула активной части (например, лиганд-связывающей части) ActRIIB содержит аминокислоты 29-109 SEQ ID NO: 1. Таким образом, полипептиды ActRIIB могут содержать, по существу состоять или состоять, например, из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична части ActRIIB, начинающейся в остатке, соответствующем любой из аминокислот 20-29 (например, начинающейся в любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) SEQ ID NO: 1, и оканчивающейся в положении, соответствующем любой из аминокислот 109-134 (например, оканчивающейся в любой из аминокислот 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 или 134) SEQ ID NO: 1. Другие примеры включают полипептиды, которые начинаются в положении 20-29 (например, любое из положений 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) или 21-29 (например, любое из положений 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) SEQ ID NO: 1 и оканчиваются в положении 119-134 (например, любое из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134), 119-133 (например, любое из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 или 133), 129-134 (например, любое из положений 129, 130, 131, 132, 133 или 134) или 129-133 (например, любое из положений 129, 130, 131, 132 или 133) SEQ ID NO: 1. Другие примеры включают конструкции, которые начинаются в положении 20-24 (например, любое из положений 20, 21, 22, 23 или 24), 21-24 (например, любое из положений 21, 22, 23 или 24) или 22-25 (например, любое из положений 22, 23 или 25) SEQ ID NO: 1 и оканчиваются в положении 109-134 (например, любое из положений 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 или 134), 119-134 (например, любое из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134) или 129-134 (например, любое из положений 129, 130, 131, 132, 133 или 134) SEQ ID NO: 1. Также предусматриваются варианты в этих диапазонах, в частности, варианты, обладающие по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с соответствующей частью SEQ ID NO: 1.

Изменения, описанные в настоящем описании, можно комбинировать различным образом. В некоторых вариантах осуществления варианты ActRIIB содержат не более 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 консервативных аминокислотных замен в лиганд-связывающем кармане и ноль, одно или несколько неконсервативных изменений в положениях 40, 53, 55, 74, 79 и/или 82 лиганд-связывающего кармана. Участки вне связывающего кармана, в которых вариативность может быть особенно допустима, включают N- и C-концы внеклеточного домена (как отмечалось выше) и положения 42-46 и 65-73 (относительно SEQ ID NO: 1). Замена аспарагина на аланин в положении 65 (N65A) в действительности повышает связывание лиганда в структуре на основе A64, и, таким образом, ожидается, что она не будет иметь вредоносного эффекта на связывание лиганда в структуре на основе R64 [патент США № 7842663]. Эта замена, вероятно, устраняет гликозилирование на N65 в структуре на основе A64, таким образом, демонстрируя, что значительное изменение в этой области, вероятно, является допустимым. В то время как замена R64A мало допустима, замена R64K является допустимой, и таким образом, другой основной остаток, такой как H, может быть допустимым в положении 64 [патент США № 7842663]. Кроме того, результаты программы мутагенеза, описанные в данной области, указывают на то, что существуют положения аминокислот в ActRIIB, которые часто полезно сохранить. В отношении SEQ ID NO: 1, они включают положение 80 (кислотная или гидрофобная аминокислота), положение 78 (гидрофобная, и, в частности, триптофан), положение 37 (кислотная, и, в частности, аспарагиновая или глутаминовая кислота), положение 56 (основная аминокислота), положение 60 (гидрофобная аминокислота, в частности, фенилаланин или тирозин). Таким образом, изобретение относится к каркасу из аминокислот, который может быть сохранен

в полипептидах ActRIIB. Другие положения, которые может быть желательным сохранить, являются следующими: положение 52 (кислотная аминокислота), положение 55 (основная аминокислота), положение 81 (кислотная), 98 (полярная или заряженная, в частности, E, D, R или K), во всех случаях относительно SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы.

Предпочтительно полипептиды ActRIIB для применения в соответствии с изобретением являются растворимыми (например, внеклеточный домен ActRIIB). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB для применения в соответствии с изобретением связываются с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF-бета. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептиды ActRIIB для применения в соответствии с изобретением ингибируют (являются антагонистами) активность (например, ингибирование передачи сигнала Smad) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична части ActRIIB, начинающейся остатком, соответствующем аминокислотам 20-29 (например, начинающейся любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) SEQ ID NO: 1 и оканчивающейся в положении, соответствующем аминокислотам 109-134 (например, оканчивающейся любой из аминокислот 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 или 134) SEQ ID NO: 1. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 25-131 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных вариантах осуществления гетеромультимеры по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, где аминокислотное положение, соответствующее L79 SEQ ID NO: 1, не является кислотной аминокислотой (т.е. не является встречающимся в природе аминокислотным остатком D или E или искусственной кислотной аминокислотой).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу, содержащему полипептид ActRIIA. Как используют в рамках изобретения, термин "ActRIIA" относится к семейству белков рецепторов активина типа IIA (ActRIIA) любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ActRIIA посредством мутагенеза или другой модификации.

Указание на ActRIIA в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных на настоящее время форм. Представители семейства ActRIIA, главным образом, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена, содержащего цистеин-богатую область, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ActRIIA" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ActRIIA, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Примеры таких вариантов полипептидов ActRIIA предоставлены в настоящем описании, а также в публикации международной патентной заявки № WO 2006/012627, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Нумерация аминокислот для всех родственных ActRIIA полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ActRIIA человека, предоставленной ниже (SEQ ID NO: 9), если нет иных конкретных обозначений.

Последовательность белка-предшественника ActR1IA является следующей:

```

1  MGAAAKLAFA VFLISCSSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPPC
51  YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV
101 YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI
151 AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPSPLLGLK PLQLLEVKAR
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
401 STAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG
451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM
501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 9)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием; внеклеточный домен указан полужирным шрифтом и потенциальные эндогенные участки N-связанного гликозилирования указаны двойным подчеркиванием.

Процессированная внеклеточная последовательность полипептида ActR1IA человека является следующей:

```

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID
NO: 10)

```

C-концевая "хвостовая часть" внеклеточного домена указана однократным подчеркиванием. Последовательность с делетированной "хвостовой частью" (последовательность Δ15) является следующей:

```

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 11)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ActR1IA человека, показана ниже (SEQ ID NO: 12), и соответствует нуклеотидам 159-1700 справочной последовательности Genbank NM_001616.4. Сигнальная последовательность подчеркнута.

```

1  ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GCGGTTTGCC GTCTTCTTA TCTCCTGTTC
51  TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTCTTTA
101 ATGCTAATTG GGAAAAGAC AGAACCAATC AAACTGGTGT TGAACCGTGT
151 TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
201 TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
251 ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
301 TATTTTGTGTT 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 CCCCACCTT
551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG
601 GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC
651 TGTCAAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG
701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT
751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC
801 AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG
851 TCTCTTGAA TGAACTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG
901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAACCTGC

```

951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAACAACCC
 1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAATTT TGAGGCTGGC
 1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC
 1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTGA
 1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT GGCTTCTCGC
 1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA
 1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTGTGTC
 1301 ATAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA
 1351 ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTGGGATC ACGACGCAGA
 1401 AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA
 1451 GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTACAATG
 1501 GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO:

12)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный полипептид ActR1IA, является следующей:

1 ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTCTTTA ATGCTAATTG
 51 GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA
 101 AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC
 151 ATTGAAATAG TGAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA
 201 CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTGT
 251 GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG
 301 GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC
 (SEQ ID NO: 13)

Общая формула активного (например, связывающего лиганд) полипептида ActR1IA представляет собой формулу, которая включает полипептид, который начинается с аминокислоты 30 и оканчивается аминокислотой 110 SEQ ID NO: 9. Таким образом, полипептиды ActR1IA по настоящему изобретению могут включать полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. Необязательно, полипептиды ActR1IA по настоящему изобретению включают полипептид, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотам 12-82 SEQ ID NO: 9, необязательно начинающийся в положении 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) или 3-5 (например, 3, 4 или 5) и оканчивающийся в положении 110-116 (например, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или 116) или 110-115 (например, 110, 111, 112, 113, 114 или 115), соответственно, и содержащий не более 1, 2, 5, 10 или 15 консервативных аминокислотных замен в лиганд-связывающем кармане, и ноль, одно или несколько неконсервативных изменений в положениях 40, 53, 55, 74, 79 и/или 82 лиганд-связывающего кармана относительно SEQ ID NO: 9.

В определенных вариантах осуществления изобретения относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ActR1IA для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ActR1IA, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ActR1IA). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActR1IA для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 409 или 410. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат, состоит или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида ActR1IA, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 409 или 410.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид TGFBR1I. Как используют в рамках изобретения, термин "TGFBR1I" относится к семейству белков рецепторов II трансформирующего фактора роста-бета (TGFBR1I) любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков посредством мутагенеза или другой модификации. Указание TGFBR1I в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства TGFBR1I, как правило, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид TGFBR11" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства TGFBR11, также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных TGFBR11 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника TGFBR11 человека ниже (SEQ ID NO: 42), если нет иных конкретных обозначений.

Каноническая последовательность белка-предшественника TGFBR11 человека (NCBI Ref Seq NP_003233.4) является следующей:

```

1 MGRGLLRGLW PLHIVLWTRI ASTIPPHVQK SVNNDMIVTD NNGAVKFPQL
51 CKFCDVRFST CDNQKSCMSN CSITSICEKP QEVCVAVWRK NDENITLETV
101 CHDPKLPYHD FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFMCS CSS DECNDNIIFS
151 EEYNTSNPDL LLVIFQVTGI SLLPPLGVAI SVIIIFYCYR VNRQQLSST
201 WETGKTRKLM EFSEHCAIIL EDDRS DISST CANNINH NTE LLPIELDTLV
251 GKGRFAEVYK AKLKQNTSEQ FETVAVKIFP YEEYASWKTE KDIFSDINLK
301 HENILQFLTA EERKTELKQ YWLITAFHAK GNLQEYLTRH VISWEDLRKL
351 GSSLARGIAH LHS DHTPCGR PKMPIVHRDL KSSNILVKND LTCCLDFGL
401 SLRLDPTLSV DDLANS GQVG TARYMAPEVL ESRMNLNVE SFKQTDVYSM
451 ALVLWEMTSR CNAVGEVKDY EPPFGSKVRE HPCVESMKDN VLRDRGRPEI
501 PSFWLNHQGI QMVCETL TEC WDHDPEARLT AQCVAERFSE LEHLDRLSGR
551 SCSEEKIPED GSLNTTK (SEQ ID NO: 42)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида TGFBR11 является следующей:

```

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQ
EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETTFMCS CSS DECND
NIIFSEEYNTSNPDL LLVIFQ (SEQ ID NO: 43)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник TGFBR11, представлена ниже (SEQ ID NO: 44), и соответствует нуклеотидам 383-2083 справочной последовательности Genbank NM_003242.5. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGGGTCTGGGGGCTGCTCAGGGGCTGTGGCCGCTGCACATCGTCTGTGGACGGTAT
CGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAAC
AACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACGTGTAAATTTGTGATGTGAGATTTCCACCTGTGACA
ACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTG
TGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAG
CTCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATATGAAGGAAAAAA
AAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGAATGACAACATCAT
CTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAAGTACAGGC
ATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTATCATCATCTTCTACTGCTACCGCG
TTAACCGGCAGCAGAAGCTGAGTTCAACCTGGGAAACCGGCAAGACGCGGAAGCTCATGGAGTT
CAGCGAGCACTGTGCCATCATCTGGAAGATGACCGCTCTGACATCAGCTCCACGTGTGCCAAC
AACATCAACCACAACACAGAGCTGCTGCCATTGAGCTGGACACCCCTGGTGGGAAAGGTGCT
TTGCTGAGGTCTATAAGGCCAAGCTGAAGCAGAACACTTCAGAGCAGTTTGGAGCAGTGGCAGT
CAAGATCTTTCCCTATGAGGAGTATGCCCTTTGGAAGACAGAGAAGGACATCTTCTCAGACATC
AATCTGAAGCATGAGAACATACTCCAGTTCTGACGGCTGAGGAGCGGAAGACGGAGTTGGGGA
AACATACTGGCTGATCACCGCCTTCCACGCCAAGGGCAACCTACAGGAGTACCTGACCGGCCA
TGTCATCAGCTGGGAGGACCTGCGCAAGCTGGGCAGCTCCCTCGCCGGGGGATTGCTCACCTC
CACAGTGATCACACTCCATGTGGGAGGCCAAGATGCCATCGTGCACAGGGACCTCAAGAGCT
CCAATATCCTCGTGAAGAACGACCTAACCTGCTGCCTGTGTGACTTTGGGCTTTCCCTGCGTCT
GGACCTACTCTGTCTGTGGATGACCTGGCTAACAGTGGGCAGTGGGAACTGCAAGATACATG
GCTCCAGAAGTCCTAGAATCCAGGATGAATTTGGAGAATGTTGAGTCTTCAAGCAGACCGATG
TCTACTCCATGGCTCTGGTCTCTGGGAAATGACATCTCGCTGTAATGCAGTGGGAGAAATGAA
AGATTATGAGCCTCCATTTGGTTCCAAGGTGCGGGAGCACCCCTGTGTGAAAGCATGAAGGAC
AACGTGTTGAGAGATCGAGGGCGACCAGAAATTTCCAGCTTCTGGCTCAACCACAGGGCATCC
AGATGGTGTGTGAGACGTTGACTGAGTGTGGGACCACGACCAGAGGCCCGTCTCACAGCCCA
GTGTGTGGCAGAACGCTTCAGTGTGAGCTGGGACATCTGGACAGGCTCTCGGGGAGGAGTGTCTG
GAGGAGAAGATTCTGAAGACGGCTCCCTAAACACTACCAAA (SEQ ID NO: 44)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный поли-
пептид TGFBR2, является следующей:

ACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAA
CGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACGTGTAAATTTGTGATGTGAGATTTCCACCTGTGACAAC
CAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTG
TGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCT
CCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATATGAAGGAAAAAAA
AAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGAATGACAACATCATCT
TCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAA (SEQ ID
NO: 45)

Альтернативная изоформа TGFBR2, изоформа A (NP_001020018.1), является следующей:

1 MGRGLLRGLW PLHIVLWTRI ASTIPPHVQK SDVEMEAQKD EIICPSCNRT
51 AHPLRHINND MIVTDNNGAV KFPQLCKFCD VRFSTCDNQK SCMSNCSITS
101 ICEKPOEVCV AVWRKNDENI TLETVCHDPK LPYHDFILED AASPCKIMKE
151 KKKPGETTFM CSCSSDECND NIIFSEEYNT SNPDLVVIF Q VTGISLLPP
201 LGVAISVIII FYCYRVNRQQ KLSSTWETGK TRKLMEFSEH CAIILEDERS
251 DISSTCANNI NHNTELLPIE LDTLVGKGRF AEVYKAKLQ NTSEQFETVA
301 VKIFPYEEYA SWKTEKDIFS DINLKHENIL QFLTAEERKT ELGQYWLIT
351 AFHAKGNLQE YLTRHVISWE DLRKLGSSLA RGIHLHSDH TPCGRPKMPI
401 VHRDLKSSNI LVKNDLTCCCL CDFGLSLRLD PTLSDVDDLAN SGQVGTARYM
451 APEVLESRMN LENVESFKQT DVYSMALVLW EMTSRCNAVQ EVKDYEPFPG
501 SKVREHPCVE SMKDNVLRDR GRPEIPSFVL NHQGIQMVCE TLTECWDHDP
551 EARLTAQCVA ERFSELEHLD RLSGRSCSEE KIPEDGSLNT TK (SEQ ID
NO: 67)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужир-
ным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида TGFBRII (изоформа А) является следующей:

TIPRHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHLPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCVDV
RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVAVWRKNDENITLETVCCHDPKLPYHDFILEDAASPK
CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIIFSEEYNTSNPDLVVIFQ (SEQ ID NO: 68)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник TGFBRII (изоформа А), представлена ниже (SEQ ID NO: 69), и соответствует нуклеотидам 383-2158 справочной последовательности Genbank NM_001024847.2. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGGGTTCGGGGCTGCTCAGGGGCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCCTGTGGACGCGTAT
CGCCAGCACGATCCCACCGCAGTTCAGAAGTCGGATGTGAAATGGAGGCCAGAAAGATGAA
ATCATCTGCCCCAGCTGTAATAGGACTGCCCATCCACTGAGACATATTAATAACGACATGATAG
TCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTCCACAACCTGTGAAATTTGTGATGTGAGATTTTC
CACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCA
CAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGGC
ATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTAT
GAAGGAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGTAGCTCTGATGAGTGAAT
GACAACATCATCTTCTCAGAAGAATAAACACCAGCAATCCTGACTTGTGTGCTAGTCATATTTT
AAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTA
CTGCTACCGCGTTAACCGGCAGCAGAAGCTGAGTTCAACCTGGGAAACCGGCAAGACGCGGAAG
CTCATGGAGTTCAGCGAGCACTGTGCCATCATCCTGGAAGATGACCGCTCTGACATCAGCTCCA
CGTGTCACAACAACATCAACCACAACACAGAGCTGCTGCCATTGAGCTGGACACCCTGGTGGG
GAAAGTTCGCTTTGCTGAGGTCTATAAGGCCAAGCTGAAGCAGAACAACCTCAGAGCAGTTTGGG
ACAGTGGCAGTCAAGATCTTTCCCTATGAGGAGTATGCCCTTTGGAAGACAGAGAAGGACATCT
TCTCAGACATCAATCTGAAGCATGAGAACAATACTCCAGTTCTGACGGCTGAGGAGCGGAAGAC
GGAGTTGGGGAACAATACTGGCTGATCACCGCCTTCCACGCCAAGGGCAACCTACAGGAGTAC
CTGACGGGCATGTCATCAGCTGGGAGGACCTGCGCAAGCTGGGCAGCTCCCTCGCCCGGGGGA
TTGCTCACCTCCACAGTGTACACTCCATGTGGGAGGCCAAGATGCCCATCGTGCACAGGGA
CCTCAAGAGCTCCAATATCCTCGTGAAGAACGACCTAACCTGCTGCCTGTGTGACTTTGGGCTT
TCCCTGCGTCTGGACCCTACTCTGTCTGTGGATGACCTGGCTAACAGTGGGCAGGTGGGAACTG
CAAGATACATGGCTCCAGAAGTCTTAGAATCCAGGATGAATTTGGAGAATGTTGAGTCTTCAA
GCAGACCGATGTCTACTCCATGGCTCTGGTGTCTGGGAAATGACATCTCGCTGTAATGCAGTG
GGAGAAGTAAAAGATTATGAGCCTCCATTTGGTTCCAAGGTGCGGGAGCACCCCTGTGTGAAA
GCATGAAGGACAACGTGTTGAGAGATCGAGGGCAGCAGAAATCCAGCTTCTGGCTCAACCA
CCAGGGCATCCAGATGGTGTGTGAGACGTTGACTGAGTGTGGGACCACGACCCAGAGGCCGT
CTCACAGCCCAGTGTGTGGCAGAACGCTTCAGTGAAGTGGAGCATCTGGACAGGCTCTCGGGGA
GGAGCTGCTCGGAGGAGAAGATTCCTGAAGACGGCTCCCTAAACACTACCAA (SEQ ID
NO: 69)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный полипептид TGFBRII (изоформа А) является следующей:

ACGATCCCACCGCAGTTCAGAAGTCGGATGTGAAATGGAGGCCAGAAAGATGAAAT
CATCTGCCCCAGCTGTAATAGGACTGCCCATCCACTGAGACATATTAATAACGACATGATAGTC
ACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTCCACAACCTGTGAAATTTGTGATGTGAGATTTTCCA
CCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACA
GGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGGCAT
GACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGA
AGGAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGAATGA
CAACATCATCTTCTCAGAAGAATAAACACCAGCAATCCTGACTTGTGTGCTAGTCATATTTCAA
(SEQ ID NO: 70).

Любая из вышеуказанных изоформ TGFβRII (SEQ ID NO: 42, 43, 67 и 68) может включать вставку из 36 аминокислот (SEQ ID NO: 95) между парой остатков глутамата (положения 151 и 152 SEQ ID NO: 42; положения 129 и 130 SEQ ID NO: 43; положения 176 и 177 SEQ ID NO: 67 или положения 154 и 155 SEQ ID NO: 68), расположенных вблизи С-конца ECD TGFβRII, как встречается в природе в изоформе TGFβRII C (Konrad et al., BMC Genomics 8:318, 2007).

GRCKIRHIGS NNRLQRSTCQ NTGWESAHVM KTPGFR (SEQ ID NO: 95). В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды TGFBR2 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид TGFBR2, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен TGFBR2). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды TGFBR2 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, 43, 67 или 68, со вставкой SEQ ID NO: 95 или без нее, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида TGFBR2, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, 43, 67 или 68, со вставкой SEQ ID NO: 95 или без нее.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид BMPRII. Как используют в рамках изобретения, термин "BMPRII" относится к семейству белков рецепторов типа II костного морфогенетического белка (BMPRII) любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков BMPRII посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на BMPRII следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства BMPRII, как правило, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена, и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид BMPRII" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства BMPRII, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных BMPRII полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника BMPRII человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 46), если нет иных конкретных обозначений.

Каноническая последовательность белка-предшественника BMPRII человека (NCBI Ref Seq NP_001195.2) является следующей:

```

1  MTSSLQRPWR VPWLPWTILL VSTAAASQNQ ERLCAFKDPY QQDLGIGESR
51 ISHENGTILC SKGSTCYGLW EKSKGDINLV KQGCWSHIGD PQECHYEECV
101 VTTTPPSIQN GTYRFCCCST DLCNVNFTEN FPPPDTTPLS PPHSFNRDET
151 IIIALASVSV LAVLIVALCF GYRMLTGDRK QGLHSMNMME AAASEPSLDL
201 DNLKLELIG RGRYGAUVYK SLDERPVAVK VFSFANRQNF INEKNIYRVP
251 LMEHDNIARF IVGDERVTAD GRMEYLLVME YYPNGSLCKY LSLHTSDWVS
301 SCRLAHSVTR GLAYLHTELP RGDHYKPAIS HRDLNSRNVL VKNDGTCVIS
351 DFGLSMRLTG NRLVRPGEED NAAISEVGTI RYMAPEVLEG AVNLRDCESA
401 LKQVDMYALG LIYWEIFMRC TDLFPGESVP EYQMAFQTEV GNHPTFEDMQ
451 VLVSREKQRP KFPEAWKENS LAVRSLKETI EDCWDQDAEA RLTAQCAEER
501 MAELMMIWER NKSVSPTVNP MSTAMQNERN LSHNRVVKI GPYPDYSSSS
551 YIEDSIHHTD SIVKNISSEH SMSSTPLTIG EKNRNSINYE RQQAQARIPS
601 PETSVTSLST NTTTNTTGL TPSTGMTTIS EMPYPDETNL HTTNVAQSIG
651 PTPVCLQLTE EDLETNKLDP KEVDKNLKE SDENLMEHSL KQFSGPDPLS
701 STSSSLLYPL IKLAVEATGQ QDFTQTANGQ ACLIPDVLPT QIYPLPKQQN
751 LPKRPTSLPL NTKNSTKEPR LKFGSKHKS LKQVETGVAK MNTINAAEPH
801 VVTVTMNGVA GRNHSVNSHA ATTQYANGTV LSGQTTNIVT HRAQEMLQNG
851 FIGEDTRLNI NSSPDEHEPL LRREQQAGHD EGVLDRLVDR RERPLEGGRT
901 NSNNNSNPC SEQDVLAQGV PSTAADPGPS KPRAQRPN LDLSATNVLD
951 GSSIQIGEST QDGKSGSGEK IKKRVKTPYS LKRWRPSTWV ISTESLDCEV
1001 NNNGSNRAVH SKSSTAVYLA EGGTATTMVS KDIGMNCL (SEQ ID NO:

```

46)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида BMPRII является следующей:

SQNQERLCAFKDPYQDDLIGESRISHENGTILCSKGSTCYGLWEKSKGDINLVKQGCW
 SHIGDPQECHYECCVVTTPPSIQNGTYRFCCSTDLNPNFTENFPDPDTPLSPHNSFNDRD
 T (SEQ ID NO: 47)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ВМРPII, показана ниже (SEQ ID NO: 48), в соответствии с нуклеотидами 1149-4262 справочной последовательности Genbank NM_001204.6. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGACTTCCTCGCTGCAGCGGCCCTGGCGGGTGCCTGGCTACCATGGACCATCCTGCT
GGTCAGCACTGCGGCTGCTTCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCGTTTAAAGATCCGTATCAG
 CAAGACCTTGGGATAGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATATTTATGCTCGAAAG
 GTAGCACCTGCTATGGCCTTTGGGAGAAATCAAAAGGGGACATAAATCTTGTAACAAGGATG
 TTGGTCTCACATTGGAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACTACCACCTCT
 CCCTCAATTCAGAATGGAACATACCGTTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACT
 TTTACTGAGAATTTTCCACCTCCTGACACAACCACTCAGTCCACCTCATTCATTTAACCGAGA
 TGAGACAATAATCATTTGCTTTGGCATCAGTCTCTGTATTAGCTGTTTTGATAGTTGCCTTATGC
 TTTGGATACAGAATGTTGACAGGAGACCGTAAACAAGGTCTTACAGTATGAACATGATGGAGG
 CAGCAGCATCCGAACCTCTCTTGTATCTAGATAATCTGAAACTGTGGAGCTGATTGGCCGAGG
 TCGATATGGAGCAGTATATAAAGCTCCTTGGATGAGCGTCCAGTTGCTGTAAAAGTGTFTTCC
 TTTGCAAACCGTCAAGATTTTATCAACGAAAAGAACATTTACAGAGTGCCTTTGATGGAACATG
 ACAACATTTGCCGCTTTATAGTTGGAGATGAGAGAGTCACTGCAGATGGACGCATGGAATATTT
 GCTTGTGATGGAGTACTATCCCAATGGATCTTTATGCAAGTATTTAAGTCTCCACACAAGTGAC
 TGGGTAAGCTCTTCCGCTTTGCTCATTCTGTTACTAGAGGACTGGCTTATCTTACACAGAAT
 TACCACGAGGAGATCATTATAAACCTGCAATTTCCCATCGAGATTTAAACAGCAGAAATGTCTT
 AGTGAAAAATGATGGAACCTGTGTTATTAGTGACTTTGGACTGTCCATGAGGCTGACTGGAAAT
 AGACTGGTGCGCCAGGGGAGGAAGATAATGCAGCCATAAGCGAGGTGGCACTATCAGATATA
 TGGCACCAAGAAGTCTAGAAGGAGCTGTGAACCTGAGGGACTGTGAATCAGCTTTGAAACAAGT
 AGACATGTATGCTCTTGGACTAATCTATTGGGAGATATTTATGAGATGTACAGACCTCTTCCCA
 GGGGAATCCGTACCAGAGTACCAGATGGCTTTTCCAGACAGAGGTTGGAACCATCCCACTTTTG
 AGGATATGCAGGTTCTCGTGTCTAGGGAAAAACAGAGACCCAAGTTCCCAGAAGCCTGGAAAGA
 AAATAGCCTGGCAGTGAAGTCACTCAAGGAGACAATCGAAGACTGTTGGGACCAGGATGCAGAG
 GCTCGGCTTACTGCACAGTGTGCTGAGGAAAGGATGGCTGAACCTTATGATGATTTGGGAAAGAA
 ACAAACTGTGAGCCCAACAGTCAATCCATGTCTACTGTATGCAGAATGAACGCAACCTGTG
 ACATAATAGGCGTGTGCCAAAAATTTGGTCTTATCCAGATTAATCTTCTCCTCATACATTGAA
 GACTCTATCCATCATACTGACAGCATCGTGAAGAATATTTCTCTGAGCATCTATGTCCAGCA
 CACCTTTGACTATAGGGGAAAAAACCGAAATTCATTAACATGAACGACAGCAAGCACAAGC
 TCGAATCCCCAGCCCTGAAACAAGTGTACCAGCCTCTCCACCAACAACAACCAACCAACACC
 ACAGGACTCACGCCAAGTACTGGCATGACTACTATATCTGAGATGCCATACCAGATGAAACAA
 ATCTGCATACCACAAATGTTGCACAGTCAATTTGGGCCAACCCCTGTCTGCTTACAGCTGACAGA
 AGAAGACTTGGAAACCAACAAGCTAGACCCAAAAGAGTTGATAAGAACCCTAAGGAAAGCTCT
 GATGAGAATCTCATGGAGCACTCTTAAACAGTTCAGTGGCCAGACCCACTGAGCAGTACTA
 GTTCTAGCTTGTCTTACCCACTCATAAACTTGCAGTAGAAGCAACTGGACAGCAGGACTTCAC
 ACAGACTGCAAAATGGCCAAGCATGTTGATTTCTGATGTTCTGCCTACTCAGATCTATCTCTC
 CCCAAGCAGCAGAACCTTCCCAAGAGACCTACTAGTTGCCTTTGAAACCAAAAAATTCACAA
 AAGAGCCCCGGCTAAAATTTGGCAGCAAGCACAATCAAACCTGAAACAAGTCGAAACTGGAGT
 TGCCAAGATGAATACAATCAATGCAGCAGAACCCTCATGTGGTGACAGTACCATGAATGGTGTG
 GCAGGTAGAAACCACAGTGTAACTCCCATGCTGCCACAACCCAAATATGCCAATGGGACAGTAC
 TATCTGGCCAAACAACCAACATAGTGACACATAGGGCCCAAGAAATGTTGCAGAATCAGTTTAT
 TGGTGAGGACACCCGGCTGAATATTAATTCAGTCTGATGAGCATGAGCCTTTACTGAGACGA
 GAGCAACAAGCTGGCCATGATGAAGGTGTTCTGGATCGTCTTGTGGACAGGAGGGAAACGGCCAC
 TAGAAGGTGGCCGAACATAATCCAAATAACAACAACAGCAATCCATGTTTCAACAAGATGTTCT
 TGACAGGGTGTTCGAAGCAGCAGCAGATCCTGGCCATCAAAGCCAGAAAGCAGCAGAGG
 CCTAATCTCTGGATCTTTCAGCCACAATGTCTGGATGGCAGCAGTATACAGATAGGTGAGT
 CAACACAAGATGGCAAATCAGGATCAGGTGAAAAGATCAAGAAACGTGTGAAAACCTCCCTATTC

TCTTAAGCGGTGGCGCCCTCCACCTGGGTCATCTCCACTGAATCGCTGGACTGTGAAGTCAAC
 AATAATGGCAGTAACAGGGCAGTTCATTCCAAATCCAGCACTGCTGTTTACCTTGCAGAAGGAG
 GCACTGCTACAACCATGGTGTCTAAAGATATAGGAATGAACTGTCTG (SEQ ID NO: 48)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внеклеточный полипептид ВМРPII, является следующей:

TCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCGTTTAAAGATCCGTATCAGCAAGACCTTGGGAT
 AGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGACAATATTATGCTCGAAAGGTAGCACCTGCTAT
 GGCCTTTGGGAGAAATCAAAAGGGGACATAAATCTTGTAACAAGGATGTTGGTCTCACATTG
 GAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACCTACCCTCCCTCAATTCAGAA
 TGGAACATACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACTTTACTGAGAATTT
 CCACCTCTGACACAACACCACTCAGTCCACCTCATTCATTTAACCGAGATGAGACA (SEQ
 ID NO: 49)

Альтернативная изоформа ВМРPII, изоформа 2 (GenBank: AAA86519.1) является следующей:

1 MTSSLQRPWR VPWLPWTILL VSTAAASQNQ ERLCAFKDPY QQDLGIGESR
 51 **ISHENGTILC** **SKGSTCYGLW** **EKSKGDINLV** **KQGCWSHIGD** **PQECHYEECV**
 101 **VTTTPPSIQN** **GTYRFCCST** **DLCNVNFTEN** **FPPDTPPLS** **PPHSFNRDET**
 151 **IIIALASVSV** **LAVLIVALCF** **GYRMLTGDRK** **QGLHSMNME** **AAASEPSLDL**
 201 **DNLKLELIG** **RGRYGAVYKG** **SLDERPVAVK** **VFSFANRQNF** **INEKNIYRVP**
 251 **LMEHDNIARF** **IVGDERVTAD** **GRMEYLLVME** **YYPNGSLCKY** **LSLHTSDWVS**
 301 **SCRLAHSVTR** **GLAYLHTELP** **RGDHYKPAIS** **HRDLNSRNVL** **VKNDGTCVIS**
 351 **DFGLSMRLTG** **NRLVRPGEED** **NAAISEVGTI** **RYMAPEVLEG** **AVNLRDCESA**
 401 **LKQVDMYALG** **LIYWEIFMRC** **TDLFPGESVP** **EYQMAFQTEV** **GNHPTFEDMQ**
 451 **VLVSREKQRP** **KFPEAWKENS** **LAVRSLKETI** **EDCWDQDAEA** **RLTAQCAEER**
 501 **MAELMMIWER** **NKSVSPTVNP** **MSTAMQNERR** (SEQ ID NO: 71)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ВМРPII (изоформа 2) является следующей:

SQNQERLCAFKDPYQQDLGIGESRISHENGTILCSKGSTCYGLWEKSKGDINLVKQGCW
 SHIGDPQECHYEECVVTTPPSIQNGTYRFCCSTDLCNVNFTENFPPDTPPLSPPHSFNRDE
 T (SEQ ID NO: 72)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ВМРPII человека (изоформа 2), показана ниже (SEQ ID NO: 73), и соответствует нуклеотидам 163-1752 справочной последовательности Genbank U25110.1. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGACTTCCTCGCTGCAGCGGCCCTGGCGGGTGCCTGGCTACCATGGACCATCTCTGCT
GGTCAGCACTGCGGGCTGCTTCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCGTTTAAAGATCCGTATCAG
CAAGACCTTTGGGATAGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATATTATGCTCGAAAG
GTAGCACCTGCTATGGCCTTTGGGAGAAAATCAAAGGGGACATAAATCTTGTAACAAGGATG
TTGGTCTCACATTGGAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACCTACCCTCCT
CCCTCAATTCAGAATGGAACATAACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACT
TTACTGAGAATTTTCCACCTCCTGACACAACACCACTCAGTCCACCTCATTCATTTAACCGAGA
TGAGACAATAATCATTTGCTTTGGCATCAGTCTCTGTATTAGCTGTTTTGATAGTTGCCTTATGC
TTTGGATACAGAATGTTGACAGGAGACCGTAAACAAGGCTTTCACAGTATGAACATGATGGAGG
CAGCAGCATCCGAACCCCTCTCTTGTATAGATAATCTGAAACTGTTGGAGCTGATTTGGCCGAGG
TCGATATGGAGCAGTATATAAAGGCTCCTTGGATGAGCGTCCAGTTGCTGTAAAAGTGTFTTCC
TTTGCAAACCGTCAGAATTTTATCAACGAAAAGAACATTTACAGAGTGCCTTTGATGGAACATG
ACAACATTTGCCCGCTTTATAGTTGGAGATGAGAGAGTCACTGCAGATGGACGCATGGAATATTT
GCTTGTGATGGAGTACTATCCCAATGGATCTTTATGCAAGTATTTAAGTCTCCACACAAGTGAC
TGGGTAAAGCTCTTGGCGTCTGCTCATTCTGTTACTAGAGGACTGGCTTATCTTCACACAGAAT
TACCACGAGGAGATCATTATAAACCCTGCAATTTCCCATCGAGATTTAAACAGCAGAAATGTCTT
AGTGAAAATGATGGAACCTGTGTTATTAGTGACTTTGGACTGTCCATGAGGCTGACTGGAAT
AGACTGGTGCGCCAGGGGAGGAAGATAATGCAGCCATAAGCGAGGTTGGCACTATCAGATATA
TGGCACCAGAAGTGTAGAGGAGCTGTGAACCTGAGGGACTGTGAATCAGCTTTGAAACAAGT
AGACATGTATGCTCTTGGACTAATCTATTGGGAGATATTTATGAGATGTACAGACCTCTTCCCA
GGGGAATCCGTACCAGAGTACCAGATGGCTTTTCAGACAGAGGTTGGAAACCATCCACCTTTTG
AGGATATGCAGGTTCTCGTGTCTAGGGAAAAACAGAGACCCAAAGTTCCAGAAAGCTGGAAAGA
AAATAGCCTGGCAGTGAGGTCACCTCAAGGAGACAATCGAAGACTGTTGGGACCAGGATGCAGAG
GCTCGGCTTACTGCACAGTGTGCTGAGGAAAGGATGGCTGAACTTATGATGATTTGGGAAAGAA
ACAAATCTGTGAGCCCAACAGTCAATCCAATGTCTACTGCTATGCAGAATGAACGTAGG (SEQ
ID NO: 73)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внеклеточный полипептид BMPRII (изоформа 2), является следующей:

TCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCGTTTAAAGATCCGTATCAGCAAGACCTTTGGGAT
AGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATATTATGCTCGAAAGGTAGCACCTGCTAT
GGCCTTTGGGAGAAAATCAAAGGGGACATAAATCTTGTAACAAGGATGTTGGTCTCACATTG
GAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACCTACCCTCCTCCATTCAGAA
TGGAACATAACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACTTTACTGAGAATTTT
CCACCTCCTGACACAACACCACTCAGTCCACCTCATTCATTTAACCGAGATGAGACA (SEQ
ID NO: 74)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы.

Предпочтительно полипептиды BMPRII для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид BMPRII, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен BMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды BMPRII для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 411 или 412. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида BMPRII, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 411 или 412.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид MISRII. Как используют в рамках изобретения, термин "MISRII" относится к семейству белков рецептора типа II мюллеровой ингибирующей субстанции (MISRII) любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков MISRII посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на MISRII в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства MISRII, главным образом, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой обла-

стью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид MISRII" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства MISRII, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислоты для всех родственных полипептид MISRIIob основана на нумерации последовательности белка-предшественника MISRII человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 50), если нет иных конкретных обозначений.

Каноническая последовательность белка-предшественника MISRII человека (NCBI Ref Seq NP_065434.1) является следующей:

```

1  MLGSLGLWAL LPTAVEAPPN RRTCVFFEAP GVRGSTKTLG ELLDTGTELP
51  RAIRCLYSRC CFGIWNLTQD RAQVEMQGCR DSDEPGCESL HCDPSPRAHN
101 SPGSTLFTCS CGTDFCNANY SHLPPPGSPG TPGSQGPQAA PGESIWMALV
151 LLGLFLLLLL LLGSIIALLL QRKNYRVRGE FVPEPRPDSG RDWSVELQEL
201 PELCFSQVIR EGGHAVVWAG QLQGKLVAIK AFPPRSVAQF QAERALYELP
251 GLQHDHIVRF ITASRGGPGR LLSGPLLVL LHPKGSLSCHY LTQYTSWDWS
301 SLRMALSLAQ GLAFLHEERW QNGQYKPGIA HRDLSSQNVL IREDGSCAIG
351 DLGLALVLPG LTQPPAWTPT QPQGPAAIME AGTQRYMAPE LLDKTLDLQD
401 WGMALRRADI YSLALLLWEI LSRCPLLRPD SSPPPFQLAY EAELGNTPTS
451 DELWALAVQE RRRPYIPSTW RCFATDPDGL RELLEDCWDA DPEARLTAEC
501 VQORLAALAH PQESHPPFES CPRGCPPLCP EDCTSIPAPT ILPCRPQRSA
551 CHFSVQQGPC SRNPQPACTL SPV (SEQ ID NO: 50)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида MISRII является следующей:

```

PPNRRTCVFFEAPGVRGSTKTLGELLDTGTELPRAIRCLYSRCCFGIWNLTQDRAQVEM
QGCRDSDEPGCESLHCDPSPRAHNSPGSTLFTCSCGTDFCNANYSHLPPPGSPGTPGSQGPQAA
PGESIWMAL (SEQ ID NO: 51)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник MISRII, показана ниже (SEQ ID NO: 52), и соответствует нуклеотидам 81-1799 справочной последовательности Genbank NM_020547.2. Сигнальная последовательность подчеркнута.

```

ATGCTAGGGTCTTTGGGGCTTTGGGCATTACTTCCCACAGCTGTGGAAGCACCCCAAA
CAGGCGAACCTGTGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGCAGGGGAAGCACAAAGACACTGGGAGAG
CTGCTAGATACAGGCACAGAGCTCCCAGAGCTATCCGCTGCCCTACAGCCGCTGCTGCTTTG
GGATCTGGAACCTGACCCAAGACCGGGCACAGGTGGAAATGCAAGGATGCCGAGACAGTGATGA
GCCAGGCTGTGAGTCCCTCCACTGTGACCCAAGTCCCGAGCCACCCAGCCCTGGCTCCACT
CTCTTACCTGCTCCTGTGGCACTGACTTCTGCAATGCCAATTACAGCCATCTGCCTCCTCCAG
GGAGCCCTGGGACTCCTGGCTCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGTCCATCTGGATGGC
ACTGGTGTGCTGCTGGGGCTGTTCCCTCCTCCTGCTGCTGCTGGGCAGCATCATCTTGGCCCTG
CTACAGCGAAAGAACTACAGAGTGCAGAGGTGAGCCAGTGCCAGAGCCAAGGCCAGACTCAGGCA
GGGACTGGAGTGTGGAGCTGCAGGAGCTGCCTGAGCTGTGTTTCTCCAGGTAATCCGGGAAGG
AGGTCATGCAGTGGTTTGGGCCGGGAGCTGCAAGGAAAAGTGGTTGCCATCAAGGCCTTCCCA
CCGAGGCTGTGGCTCAGTTCCAAGCTGAGAGAGCATGTACGAACTTCCAGGCCTACAGCACG
ACCACATGTCCGATTTATCACTGCCAGCCGGGGGGTCTGGCCGCTGCTCTTGGGCCCTT
GCTGGTACTGGAAGTGCATCCCAAGGGTCCCTGTGCCACTACTTGACCCAGTACACCAGTGAC
TGGGGAAGTTCCTGCGGATGGCACTGTCCCTGGCCAGGGCTGGCATTCTCCATGAGGAGC
GCTGGCAGAATGGCCAATATAAACAGGTATTGCCACCAGATCTGAGCAGCCAGAATGTGCT
CATTCGGAAGATGGATCGTGTGCCATTGGAGACCTGGGCCTTGCTTGGTGTCTCCCTGGCCTC
ACTCAGCCCCCTGCCTGGACCCCTACTCAACCACAAGGCCAGCTGCCATCATGGAAGCTGGCA
CCCAGAGGTACATGGCACCAGAGCTCTTGACAAGACTCTGGACCTACAGGATTGGGGCATGGC
CCTCCGACGAGCTGATATTTACTCTTTGGCTCTGCTCCTGTGGGAGATACTGAGCCGCTGCCCA
GATTTGAGGCCTGACAGCAGTCCACCACCTTCCAAGTGGCCTATGAGGCAGAAGTGGGCAATA
CCCCTACCTCTGATGAGCTATGGGCCTTGGCAGTGCAGGAGAGGAGGCGTCCCTACATCCCATC

```

CACCTGGCGCTGCTTTGCCACAGACCCCTGATGGGCTGAGGGAGCTCCTAGAAGACTGTTGGGAT
 GCAGACCCAGAAGCACGGCTGACAGCTGAGTGTGTACAGCAGCGCCTGGCTGCCTTGGCCATC
 CTCAAGAGAGCCACCCCTTTCCAGAGAGCTGTCCACGTGGCTGCCACCTCTCTGCCAGAGA
 CTGTACTTCAATTCTGCCCTACCATCCTCCCTGTAGGCCTCAGCGGAGTGCTGCCACTTC
 AGCGTTCAGCAAGGCCCTTGTTCAGGAATCCTCAGCCTGCCTGTACCCTTTCTCTCTGTG
 (SEQ ID NO: 52)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный полипептид MISRII человека, является следующей:

CCCCAAACAGGCGAACCTGTGTGTCTTTGAGGCCCTGGAGTGCGGGGAAGCACAAA
 GACACTGGGAGAGCTGTAGATACAGGCACAGAGCTCCCCAGAGCTATCCGCTGCCTCTACAGC
 CGCTGCTGCTTTGGGATCTGGAACCTGACCCAAGACCGGGCACAGGTGAAATGCAAGGATGCC
 GAGACAGTGATGAGCCAGGCTGTGAGTCCCTCCACTGTGACCCAAGTCCCGAGCCACCCAG
 CCCTGGCTCCACTCTCTCACCTGCTCCTGTGGCACTGACTTCTGCAATGCCAATTACAGCCAT
 CTGCCCTCCTCCAGGGAGCCCTGGGACTCCTGGCTCCAGGGTCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGT
 CCATCTGGATGGCACTG (SEQ ID NO: 53)

Альтернативная изоформа последовательности белка-предшественника MISRII человека, изоформа 2 (NCBI Ref Seq NP_001158162.1), является следующей:

1 MLGSLGLWAL LPTAVEAPN RRTCFFEAP GVRGSKTLG ELLDTGTELP
 051 RAIRCLYSRC CFGIWNLTQD RAQVEMQGCR DSDEPGCESL HCDPSPRANP
 101 SPGSTLFTCS CGTDFCNANY SHLPPPGSPG TPGSQGPQAA PGESIWMALV
 151 LLGLFLLLLL LLGSIIALL QRKNYRVRGE PVPEPRPDSG RDWSVELQEL
 201 PELCFSQVIR EGGHAVVWAG QLQGLVAIK AFPPRSVAQF QAERALYELP
 251 GLQHDHIVRF ITASRGGPGR LLSGPLLVLE LHPKGSLSCHY LTQYTSDWGS
 301 SLRMALSLAQ GLAFLHEERW QNGQYKPGIA HRDLSSQNVL IREDGSCAIG
 351 DLGLALVLP LTQPPAWTPT QPQGPAAIME AGTQRYMAPE LLDKTLDLQD
 401 WGMALRRADI YSLALLWEI LSRCPDLRPA VHHPNSWPMR QNWAIPLPLM
 451 SYGPWQCRRG GVPTSHPPGA ALPQTLMG (SEQ ID NO: 75)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида MISRII (изоформа 2) является следующей:

PPNRRTCVFFEAPGVRGSKTLGELLDTGTELPRAIRCLYSRCCFGIWNLTQDRAQVEM
 QGCRDSDEPGCESLHCDPSPRANPSPGSTLFTCSCGTDFCNANYSHLPPPGSPGTPGSQGPQAA
 PGESIWMAL (SEQ ID NO: 76)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник MISRII (изоформа 2) показана ниже (SEQ ID NO: 77), и соответствует нуклеотидам 81-1514 справочной последовательности Genbank NM_001164690.1. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGCTAGGGTCTTTGGGCTTTGGGCATTACTTCCCACAGCTGTGGAAGCACCCCCAAA
 CAGGCGAACCTGTGTGTCTTTGAGGCCCTGGAGTGCGGGGAAGCACAAAGACACTGGGAGAG
 CTGCTAGATACAGGCACAGAGCTCCCCAGAGCTATCCGCTGCCTCTACAGCCGCTGCTGCTTTG
 GGATCTGGAACCTGACCCAAGACCGGGCACAGGTGAAATGCAAGGATGCCGAGACAGTGATGA
 GCCAGGCTGTGAGTCCCTCCACTGTGACCCAAGTCCCGAGCCACCCAGCCCTGGCTCCACT
 CTCTTACCTGCTCCTGTGGCACTGACTTCTGCAATGCCAATTACAGCCATCTGCCTCCTCCAG
 GGAGCCCTGGGACTCCTGGCTCCAGGGTCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGTCCATCTGGATGGC
 ACTGGTGCTGCTGGGGCTGTTCTCCTCCTCCTGCTGCTGCTGGGCAGCATCATCTGGCCCTG
 CTACAGCGAAAGAACTACAGAGTGCGAGGTGAGCCAGTGCCAGGCCAAGGCCAGACTCAGGCA
 GGGACTGGAGTGTGGAGCTGCAGGAGCTGCCTGAGCTGTGTTCTCCCAGGTAATCCGGGAAGG
 AGGTCATGCAGTGGTTTGGGCCGGGCAGCTGCAAGGAAAAGTGGTTGCCATCAAGGCCCTCCCA
 CCGAGGTCTGTGGCTCAGTTCCAAGCTGAGAGAGCATTGTACGAACTTCCAGGCCCTACAGCAGC

ACCACATTGTCCGATTTATCACTGCCAGCCGGGGGGTCTGGCCGCCTGCTCTCTGGGCCCT
 GCTGGTACTGGAAGTGCATCCCAAGGGCTCCCTGTGCCACTACTTGACCCAGTACACCAGTGAC
 TGGGGAAGTTCCTGCGGATGGCACTGTCCCTGGCCAGGGCTGGCATTCTCCATGAGGAGC
 GCTGGCAGAATGGCCAATATAAACCAGGTATTGCCACCGAGATCTGAGCAGCCAGAATGTGCT
 CATTCCGGGAAGATGGATCGTGTGCCATTGGAGACCTGGGCCCTGGCTTGGTGCTCCCTGGCCTC
 ACTCAGCCCCCTGCCTGGACCCCTACTCAACCACAAGGCCAGCTGCCATCATGGAAGCTGGCA
 CCCAGAGGTACATGGCACCAGAGCTTTGGACAAGACTCTGGACCTACAGGATTGGGGCATGGC
 CCTCCGACGAGCTGATATTTACTCTTTGGCTCTGCTCCTGTGGGAGATACTGAGCCGCTGCCCA
 GATTTGAGGCCTGCAGTCCACCACCTTCCAAGTGGCTATGAGGCAGAAGTGGCAATACCCC
 TACCTCTGATGAGCTATGGGCCTTGGCAGTGCAGGAGAGGAGCGTCCCTACATCCCATCCACC
 TGGCGCTGCTTTGCCACAGACCCTGATGGGC (SEQ ID NO: 77)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный растворимый (внеклеточный) полипептид MISRII человека (изоформа 2) является следующей:

CCCCAAACAGGGCAACCTGTGTCTTTGAGGCCCTGGAGTGGGGGAAGCACAAA
 GACACTGGGAGAGCTGCTAGATACAGGCACAGAGCTCCCAGAGCTATCCGCTGCCTCTACAGC
 CGCTGCTGCTTTGGGATCTGGAACCTGACCCAAGACCGGGCACAGGTGGAATGCAAGGATGCC
 GAGACAGTGTGAGCCAGGCTGTGAGTCCCTCCACTGTGACCCAAGTCCCCGAGCCCACCCAG
 CCCTGGCTCCACTCTCTTACCTGCTCCTGTGGCACTGACTTCTGCAATGCCAATTACAGCCAT
 CTGCCTCCTCCAGGAGCCCTGGGACTCCTGGCTCCAGGGTCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGT
 CCATCTGGATGGCACTG (SEQ ID NO: 78)

Альтернативная изоформа последовательности белка-предшественника MISRII человека, изоформа 3 (NCBI Ref Seq NP_001158163.1), является следующей:

1 MLGSLGLWAL LPTAVEAPPN RRTCVFFEAP GVRGSTKTLG ELLDTGTELP
 51 RAIRCLYSRC CFGIWNLTQD RAQVEMQGCR DSDEPGCESL HCDPSPRAHP
 101 SPGSTLFTCS CGTDFCNANY SHLPPPGSPG TPGSQGPQAA PGESIWMALV
 151 LLGLFLLLL LLGSIILALL QRKNYRVRGE PVPEPRPDSG RDWSVELQEL
 201 PELCFSQVIR EGHHAVVWAG QLQGKLVAIK AFPPRSVAQF QAERALYELP
 251 GLQHDHIVRF ITASRGGPGR LLSGPLLVLE LHPKGSLCHY LTQYTSDWGS
 301 SLRMALSLAQ GLAFLHEERW QNGQYKPGIA HRDLSSQNVL IREDGSCAIG
 351 DLGLALVLPG LTQPPAWTPT QPQGPAAIME DPDGLRELLE DCWDADPEAR
 401 LTAECVQQRL AALAHPQESH PFPESCPRGC PPLCPEDCTS IPAPTILPCR
 451 PQRSACHFSV QQGPCSRNPQ PACTLSSPV (SEQ ID NO: 79)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида MISRII (изоформа 3) является следующей:

PPNRRTCVFFEAPGVRGSTKTLGELLDTGTELPRAIRCLYSRCCFGIWNLTQDRAQVEM
 QGCRDSDPEPGCESLHCDPSPRAHPSPGSTLFTCSGCTDFCNANYSHLPPPGSPGTPGSQGPQAA
 PGESIWMAL (SEQ ID NO: 80)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник MISRII человека (изоформа 3) показан ниже (SEQ ID NO: 81), и соответствует нуклеотидам 81-1514 справочной последовательности Genbank NM_001164691.1. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGCTAGGGTCTTTGGGGCTTTGGGCATTACTTCCCACAGCTGTGGAAGCACCCCCAAA
 CAGGGCAACCTGTGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGCGGGAAGCACAAAGACACTGGGAGAG
 CTGCTAGATACAGGCACAGAGCTCCCCAGAGCTATCCGCTGCCTCTACAGCCGCTGTGCTTTG
 GGATCTGGAACCTGACCCAAGACCGGGCACAGGTGAAATGCAAGGATGCCGAGACAGTGATGA
 GCCAGGCTGTGAGTCCCTCCACTGTGACCCAAGTCCCCGAGCCCACCCAGCCCTGGCTCCACT
 CTCTTACCTGCTCCTGTGGCACTGACTTCTGCAATGCCAATTACAGCCATCTGCCTCCTCCAG
 GGAGCCCTGGGACTCCTGGCTCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGTCCATCTGGATGGC
 ACTGGTGTGCTGGGGCTGTTCTCTCTCCTCTGCTGCTGCTGGGCAGCATCATCTTGGCCCTG
 CTACAGCGAAAGAACTACAGAGTGCAGAGTGCAGGAGTGCAGCCAGTGCAGAGCAAGGCCAGACTCAGGCA
 GGGACTGGAGTGTGGAGCTGCAGGAGCTGCCTGAGCTGTGTTTCTCCAGGTAATCCGGGAAGG
 AGGTGATGCAAGTGGTTGGGGCCGGGACAGTGCAGGAAAAGTGGTTGCCATCAAGGCCCTTCCCA
 CCGAGGTCTGTGGCTCAGTTCAGCTGAGAGAGCATGTACGAACCTCCAGGCCTACAGCACG
 ACCACATGTCCGATTTATCACTGCCAGCCGGGGGGTCTGGCCGCCTGCTCTCTGGGCCCT
 GCTGGTACTGGAAGTGCATCCCAAGGGCTCCCTGTGCCACTACTTACCCAGTACACCAGTAC
 TGGGGAAGTTCCTGCGGATGGCACTGTCCCTGGCCCAGGCTGGCATTCTCCATGAGGAGC
 GCTGGCAGAATGGCCAATATAAACCAGGTATTGCCACCGAGATCTGAGCAGCCAGAATGTGCT
 CATTCGGGAAGATGGATCGTGTGCCATTGGAGACCTGGGCCCTTGCCTTGGTGTCTCCCTGGCCTC
 ACTCAGCCCCCTGCCTGGACCCCTACTCAACCACAAGGCCAGCTGCCATCATGGAAGACCCCTG
 ATGGGCTGAGGGAGCTCCTAGAAGACTGTTGGGATGCAGACCCAGAAGCACGGCTGACAGCTGA
 GTGTGTACAGCAGCGCCTGGCTGCCTTGGCCATCCTCAAGAGAGCCACCCCTTCCAGAGAGC
 TGTCACAGTGGCTGCCACCTCTGCCCCAGAAGACTGTACTTCAATTCCTGCCCTTACCATCC
 TCCCTGTAGGCCTCAGCGGAGTGCCTGCCACTTCAGCGTTCAGCAAGGCCCTTGTTCAGGAA
 TCCTCAGCCTGCCTGTACCCTTTCTCTGTG (SEQ ID NO: 81)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный растворимый (внеклеточный) полипептид MISRII человека (изоформа 3) является следующей:

CCCCAAACAGGGCAACCTGTGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGCGGGAAGCACAAA
 GACACTGGGAGAGCTGCTAGATACAGGCACAGAGCTCCCCAGAGCTATCCGCTGCCTCTACAGC
 CGTGTGCTGCTTTGGGATCTGGAACCTGACCCAAGACCGGGCACAGGTGAAATGCAAGGATGCC
 GAGACAGTGATGAGCCAGGCTGTGAGTCCCTCCACTGTGACCCAAGTCCCCGAGCCCACCCAG
 CCCTGGCTCCACTCTCTTACCTGCTCCTGTGGCACTGACTTCTGCAATGCCAATTACAGCCAT
 CTGCCTCCTCCAGGGAGCCCTGGGACTCCTGGCTCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCAGGTGAGT
 CCATCTGGATGGCACTG (SEQ ID NO: 82)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды MISRII для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид MISRII, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды MISRII для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99 идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79 или 80. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида ISRII, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79 или 80.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK1. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK1" относится семейству белков подобной рецептору активина киназы 1 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK1 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK1 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK1 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK1" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе

полипептид представителя семейства ALK1, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK1 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK1 человека ниже (SEQ ID NO: 14), если нет иных конкретных обозначений.

Последовательность белка-предшественника ALK1 человека (NCBI Ref Seq NP_000011.2) является следующей:

```

1  MTLGSPRKGL LMLLMALVTQ GDPVKPSRGP LVTCTCESPH CKGPTCRGAW
51  CTVVLVREEG RHPQENRGG NLHRELCRGR PTEFVNHYCC DSHLCNHNVS
101 LVLEATQPPS EQPGTDGQLA LILGPVLALL ALVALGVLGL WHVRRRQEKQ
151 RGLHSELGES SLILKASEQG DSMLGDLLDS DCTTGSGLSGL PFLVQRTVAR
201 QVALVECVGK GRYGEVWRGL WHGESVAVKI FSSRDEQSWF RETEIYNTVL
251 LRHDNILGFI ASDMTRNSS TQLWLITHYH EHGSLYDFLQ RQTLPHLAL
301 RLAVSAACGL AHLHVEIFGT QGKPAIAHRD FKSARNVLVKS NLQCCIADLG
351 LAVMHSQGS YLDIGNNPRV GTKRYMAPEV LDEQIRTDCE ESYKWTDIWA
401 FGLVLWEIAR RTIVNGIVED YRPPFYDVVP NDPSFEDMKK VVCVDQQTPT
451 IPNRLAADPV LSGLAQMMRE CWYPNPSARL TALRIKKTQ KISNSPEKPK
501 VIQ (SEQ ID NO: 14)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK1 является следующей:

```
DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQENRGGCNLHRELCRGR
```

```
PTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQ (SEQ ID NO: 15)
```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник ALK1 человека, показана ниже (SEQ ID NO: 16), и соответствует нуклеотидам 284-1792 справочной последовательности Genbank NM_000020.2. Сигнальная последовательность подчеркнута.

```

ATGACCTTGGGCTCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGACCCA
GGGAGACCCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGCTGTGAGAGCCCACATTCG
AAGGGCCTACCTGCCGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACC
CCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTT
CGTCAACCACACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGCTGTCCCTGGTGCTGGAGGCC
ACCCAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGCTGGCCCTGATCCTGGGCCCGTGC
TGGCCTTGCTGGCCCTGGTGCCCTGGGTGTCTGGCCCTGTGGCATGTCCGACGGAGGCAGGA
GAAGCAGCGTGGCCTGCACAGCGAGCTGGGAGAGTCCAGTCTCATCCTGAAAGCATCTGAGCAG
GGCGACAGCATGTTGGGGACCTCCTGGACAGTGAAGTGCACCACAGGGAGTGGCTCAGGGCTCC
CCTCCTGGTGAGGACAGTGGCACGGCAGGTTGCCTTGGTGGAGTGTGTGGGAAAAGGCCG
STATGGCAAGTGTGGCGGGCTTGTGGCACGGTGAAGTGTGGCCGTCAAGATCTTCTCCTCG
AGGGATGAACAGTCTGGTTCGGGAGACTGAGATCTATAACACAGTGTGCTCAGACACGACA
ACATCCTAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTCCCGCAACTCGAGCACGCAGCTGTGGCTCAT
CACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTACGACTTCTGACAGACAGACGCTGGAGCCCCAT
CTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGGGCATGCGGCCCTGGCGCACCTGCACGTGGAGATCTTCG
GTACACAGGGCAAACCAGCCATTGCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAG
CAACCTGCAGTGTGCATCGCCGACCTGGCCCTGGCTGTGATGCACTCACAGGGCAGCGATTAC
CTGGACATCGGCAACAACCCGAGAGTGGGCACCAAGCGGTACATGGCACCCGAGGTGCTGGACG
AGCAGATCCGCACGGACTGCTTTGAGTCTTACAAGTGGACTGACATCTGGCCCTTTGGCCCTGGT
GCTGTGGGAGATTGCCCGCCGACCATCGTGAATGGCATCGTGGAGGACTATAGACCACCCTTC
TATGATGTGGTGCCTAATGACCCAGCTTTGAGGACATGAAGAAGGTGGTGTGTGTGGATCAGC
AGACCCCAACCATCCCTAACCGGCTGGCTGCAGACCCGGTCTCTCAGGCCTAGCTCAGATGAT
GCGGGAGTGTGGTACCCAAACCCCTTGCCTGACTCACCGGCTGCGGATCAAGAAGACACTA
CAAAAAATTAGCAACAGTCCAGAGAAGCCTAAAGTGATTCAA (SEQ ID NO: 16)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая процессированный внеклеточный полипептид ALK1, является следующей:

GACCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCACATG
 CAAGGGGCCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCAC
 CCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGT
 TCGTCAACCACTACTGTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGTGGAGGC
 CACCCAACCTCCTTCGGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAG (SEQ ID NO: 17)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK1 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK1, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK1). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK1 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 413 или 414. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят по меньшей мере из одного полипептида ALK1, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 413 или 414.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK2. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK2" относится к семейству белков подобной рецептору активина киназы 2 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK2 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK2 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK2 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK2" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ALK2, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK2 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK2 человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 18), если нет иных конкретных обозначений.

Последовательность белка-предшественника ALK2 человека (NCBI Ref Seq NP_001096.1) является следующей:

1 MVDGVMLIPV LIMIALPSPS MEDEKPKVNP KLYMCVCEGL SCGNEDHCEG
 51 QQCFSSLSIN DGFHVYQKGC FQVYEQQGKMT CKTPPSPGQA VECCQGDWCN
 101 RNITAQLPTK GKSFPGTQNF HLEVGLIILS VVFAVCLLAC LLGVALRKFK
 151 RRNQRRLNPR DVEYGTIEGL ITTNVGDSTL ADLLDHSCTS GSGSGLPFLV
 201 QRTVARQITL LECVKGGRYG EVWRGSWQGE NVAVKIFSSR DEKSWFRETE
 251 LYNTVMLRHE NILGFIASDM TSRHSSTQLW LITHYHEMGS LYDYLQLTTL
 301 DTVSCLRIVL SIASGLAHLH IEIFGTQGKP AIAHRDLKSK NILVKKNGQC
 351 CIADLGLAVM HSQSTNQLDV GNNPRVGTKR YMAPEVLDET IQVDCFDSYK
 401 RVDIWAFLV LWEVARRMVS NGIVEDYKPP FYDVVPNDPS FEDMRKVVCV
 451 DQQRPNIPNR WFSDP~~TL~~TSL AKLMKECWYQ NPSARLTALR IKKTLTKIDN
 501 SLDK~~KL~~TD (SEQ ID NO: 18)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK2 является следующей:

MEDEKPKVNP KLYMCVCEGL SCGNEDHCEG QQCFSSLSIN DGFHVYQKGC FQVYEQQGKMT

CKTPPSPGQA VECCQGDWCN RNITAQLPTK GKSFPGTQNF HLE (SEQ ID NO: 19)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK2 человека, показана ниже (SEQ ID NO: 20), и соответствует нуклеотидам 431-1957 справочной последовательности Genbank NM_001105.4. Сигнальная последовательность подчеркнута.

ATGGTAGATGGAGTGATGATTCTTCCTGTGCTTATCATGATTGCTCTCCCCTCCCCTAG
TATGGAAGATGAGAAGCCCAAGGTCAACCCCAAACCTACATGTGTGTGTGAAGGTCTCTCC
TGCGGTAATGAGGACCACTGTGAAGGCCAGCAGTGCTTTTCCCTCACTGAGCATCAACGATGGCT
TCCACGCTTACCAGAAAGGCTGCTTCCAGGTTTATGAGCAGGAAAGATGACCTGTAAGACCCC
GCCGTCCCCTGGCCAAGCCGTGGAGTGCTGCCAAGGGGACTGGTGTAAACAGGAACATCACGGCC
CAGCTGCCCACTAAAGGAAAATCCTTCCCTGGAACACAGAATTTCCACTTGGAGTTGGCCTCA
TTATTCTCTCTGTAGTGTTCGCAGTATGTCTTTTAGCCTGCCTGCTGGGAGTTGCTCTCCGAAA
ATTTAAAAGGCGCAACCAAGAACGCCTCAATCCCCGAGACGTGGAGTATGGCACTATCGAAGGG
CTCATCACCACCAATGTTGGAGACAGCACTTTAGCAGATTTATTGGATCATTCTGTACATCAG
GAAGTGGCTCTGGTCTTCCCTTTCTGGTACAAAGAACAGTGGCTCGCCAGATTACACTGTTGGA
GTGTGTGCGGAAAGGCAGGTATGGTGGAGGTGTGGAGGGGAGCTGGCAAGGGGAGAATGTTGCC
GTGAAGATCTTCTCCTCCCGTATGAGAAGTCATGGTTCAGGAAACGGAATTTACAACACTG
TGATGCTGAGGCATGAAAATATCTTAGGTTTCATTGCTTCAGACATGACATCAAGACACTCCAG
TACCAGCTGTGGTTAATTACACATTATCATGAAATGGGATCGTTGTACGACTATCTTCAGCTT
ACTACTCTGGATACAGTTAGCTGCCTTCGAATAGTGTGTCATAGCTAGTGGTCTTGACATT
TGCATAGAGATATTTGGGACCCAAGGAAACCAGCCATTGCCATCGAGATTTAAAGAGCAA
AAATATTCTGGTTAAGAAGAATGGACAGTGTTCATAGCAGATTTGGGCCTGGCAGTATGCAT
TCCCAGAGCACCATCAGCTTGATGTGGGAACAATCCCCGTGTGGGCACCAAGCGCTACATGG
CCCCGAAGTCTAGATGAAACCATCCAGGTGGATTGTTTCGATTCTATAAAAGGGTCGATAT
TTGGGCCTTTGGACTTGTTTGTGGGAAGTGGCCAGGCGGATGGTGAGCAATGGTATAGTGGAG
GATTACAAGCCACCGTTCTACGATGTGGTTCCCAATGACCCAAGTTTGAAGATATGAGGAAGG
TAGTCTGTGTGGATCAACAAAGGCCAAACATACCCAACAGATGGTTCAGACCCGACATTAAC
CTCTCTGGCCAAGCTAATGAAAGAATGCTGGTATCAAAATCCATCCGCAAGACTCACAGCACTG
CGTATCAAAAAGACTTTGACCAAAATGATAATTCCTCGACAAATGAAAACCTGACTGT
 (SEQ ID NO: 20)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внеклеточный полипептид ALK2, является следующей:

ATGGAAGATGAGAAGCCCAAGGTCAACCCCAAACCTACATGTGTGTGTGAAGGTCT
 CTCTGCGGTAATGAGGACCACTGTGAAGGCCAGCAGTGCTTTTCCCTCACTGAGCATCAACGAT
 GGCTTCCACGTCTACCAGAAAGGCTGCTTCCAGGTTTATGAGCAGGAAAGATGACCTGTAAGA
 CCCCCTGCCCCTGGCCAAGCCGTGGAGTGCTGCCAAGGGGACTGGTGTAAACAGGAACATCAC
 GGCCAGCTGCCCACTAAAGGAAAATCCTTCCCTGGAACACAGAATTTCCACTTGGAG (SEQ
 ID NO: 21)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK2 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK2, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK2). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK2 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 или 19. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида ALK2, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 или 19.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK3. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK3" относится к семейству белков подобной рецептору активина киназы 3 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK3 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK3 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK3 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK3" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ALK3, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK3 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK3 человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 22), если нет иных конкретных обозначений.

Последовательность белка-предшественника ALK3 человека (NCBI Ref Seq NP_004320.2) является следующей:

```

1  MPQLYIYIRL LGAYLFIISR VQGQNLDSML HGTGMKSDSD QKKSENGVTL
APEDTLPFFLK
61  CYCSGHCPDD AINNTCITNG HCFAIIEEDD QGETTLASGC MKYEGSDFQC
KDSPKAQLRR
121  TIECCRTNLC NQYLQPTLPP VVIGPFFDGS IRWLVLLISM AVCIIAMIIF
SSCFYKHYC
181  KSISSRRRYN RDLEQDEAFI PVGESLKDLI DQSQSSGSGS GLPLLVQRTI
AKQIQMVRQV
241  GKGRYGEVWM GKWRGEKVAV KVFFTTEEAS WFRETEIYQT VLMRHENILG
FIAADIKGTG
301  SWTQLYLITD YHENGSLYDF LKCATLDTRA LLKLAISAAC GLCHLHTEIY
GTQGKPAIAH
361  RDLKSKNILI KKNSGCCAD LGLAVKFNSD TNEVDVPLNT RVGTKRYMAP
EVLDESLNKN
421  HFQPYIMADI YSFLGIWEM ARRCITGGIV EEYQLPYYNM VPSDPSYEDM
REVVCVKRLR
481  PIVSNRWNSD ECLRAVLKLM SECWAHNPAS RLTALRIKKT LAKMVESQDV
KI (SEQ ID NO: 22)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK3 является следующей:

```

1  QNLDSMLHGT GMKSDSDQKK SENGVTLAPE DTLPFLKCYC SGHCPDDAIN
NTCITNGHCF
61  AIIIEEDDQGE TTLASGCMKY EGSDFQCKDS PKAQLRRTIE CCRTNLCNQY
LQPTLPPVVI
121  GPFFDGSIR (SEQ ID NO: 23)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK3 человека, показана ниже (SEQ ID NO: 24), и соответствует нуклеотидам 549-2144 справочной последовательности Genbank NM_004329.2. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

```

1  ATGCCTCAGC TATACATTTA CATCAGATTA TTGGGAGCCT ATTTGTTCAT
CATTCTCGT
61  GTCAAGGAC AGAATCTGGA TAGTATGCTT CATGGCACTG GGATGAAATC
AGACTCCGAC
121  CAGAAAAAGT CAGAAAAATGG AGTAACCTTA GCACCAGAGG ATACCTTGCC
TTTTTTAAAG
181  TGCTATTGCT CAGGGCACTG TCCAGATGAT GCTATTAATA ACACATGCAT
ААСТААТGGA
241  CATTGCTTTG CCATCATAGA AGAAGATGAC CAGGGAGAAA CCACATTAGC
ТТCAGGGTGT
301  ATGAAATATG AAGGATCTGA TTTTCAGTGC AAAGATTCTC CAAAAGCCCA
GCTACGCCGG
361  ACAATAGAAT GTTGTCGGAC CAATTTATGT AACCAGTATT TGCAACCCAC
ACTGCCCCCT
421  GTTGTCATAG GTCCGTTTTT TGATGGCAGC ATTCGATGGC TGGTTTTGCT
САТТТСТАТG
481  GCTGTCTGCA TAATTGCTAT GATCATCTTC TCCAGCTGCT TTTGTACAA
ACATTATGTC

```

541 AAGAGCATCT CAAGCAGACG TCGTTACAAT CGTGATTGG AACAGGATGA
AGCATTTATT

601 CCAGTTGGAG AATCACTAAA AGACCTTATT GACCAGTCAC AAAGTTCTGG
TAGTGGGTCT

661 GGA CTACCTT TATTGGTTCA GCGAACTATT GCCAAACAGA TTCAGATGGT
CCGGCAAGTT

721 GGTA AAGGCC GATATGGAGA AGTATGGATG GGCAAATGGC GTGGCGAAAA
AGTGGCGGTG

781 AAAGTATTCT TTACCACTGA AGAAGCCAGC TGGTTTCGAG AAACAGAAAT
CTACCAAAT

841 GTGCTAATGC GCCATGAAAA CATACTTGGT TTCATAGCGG CAGACATTAA
AGGTACAGGT

901 TCCTGGACTC AGCTCTATTT GATTACTGAT TACCATGAAA ATGGATCTCT
STATGACTTC

961 CTGAAATGTG CTACACTGGA CACCAGAGCC CTGCTTAAAT TGGCTTATTC
AGCTGCCTGT

1021 GGTCGTGCC ACCTGCACAC AGAAATTTAT GGCACCCAAG GAAAGCCCGC
AATTGCTCAT

1081 CGAGACCTAA AGAGCAAAAA CATCCTCATC AAGAAAAATG GGAGTTGCTG
CATTGCTGAC

1141 CTGGGCCTTG CTGTTAAATF CAACAGTGAC ACAAATGAAG TTGATGTGCC
CTTGAATACC

1201 AGGGTGGGCA CCAAACGCTA CATGGCTCCC GAAGTGCTGG ACGAAAGCCT
GAACAAAAAC

1261 CACTTCCAGC CCTACATCAT GGCTGACATC TACAGCTTCG GCCTAATCAT
TTGGGAGATG

1321 GCTCGTCGTT GTATCACAGG AGGGATCGTG GAAGAATACC AATTGCCATA
TTACAACATG

1381 GTACCGAGTG ATCCGTCATA CGAAGATATG CGTGAGGTTG TGTGTGTCAA
ACGTTTGGCG

1441 CCAATTGTGT СТААТСГГТГ GAACAGTGAT GAATGTCTAC GAGCAGTTTT
GAAGСТААТГ

1501 TCAGAATGCT GGGCCACAA TCCAGCCTCC AGACTCACAG CATTGAGAAT
ТААГААГАСГ

1561 СТТГССАГА ТГГТТГААТС ССААГАТГТА ААААТС (SEQ ID NO:
24)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный полипептид ALK3 человека, является следующей:

1 CAGAATCTGG ATAGTATGCT TCATGGCACT GGGATGAAAT CAGACTCCGA
CCAGAAAAAG

61 TCAGAAAATG GAGTAACCTT AGCACCAGAG GATACCTTGC CTTTTTAA
GTGCTATTGC

121 TCAGGGCACT GTCCAGATGA TGCTATTAAT AACACATGCA ТААСТААТГГ
ACATTGCTTT

181 GCCATCATAG AAGAAGATGA CCAGGGAGAA ACCACATTAG CTCAGGGTG
TATGAAATAT

241 GAAGGATCTG ATTTTCAGTG CAAAGATTCT CCAAAGCCC AGCTACGCCG
GACAATAGAA

301 TGTGTGCGGA CCAATTTATG TAACCAGTAT TTGCAACCCA CACTGCCCCC
TGTTGTCATA

361 GGTCCGTTTT TTGATGGCAG CATTCGA (SEQ ID NO: 25)

Общая формула активного (например, связывающего лиганд) полипептида ALK3 представляет собой формулу, которая включает полипептид, который начинается в любом из аминокислотных положений 25-31 (т.е. положение 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31) SEQ ID NO: 22 и оканчивается в любом из аминокислотных положений 140-152 SEQ ID NO: 22 (т.е. 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 или 152). См. патент США 8338377, идеи которого включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплек-

сам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK3 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK3, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK3). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK3 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, начинающейся в любом из аминокислотных положений 25-31 (т.е. положение 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31) SEQ ID NO: 22 и оканчивающейся в любом из аминокислотных положений 140-153 SEQ ID NO: 22 (т.е. 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 или 152) SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 407 или 408. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят по меньшей мере из одного полипептида ALK3, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 407 или 408.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK4. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK4" относится к семейству белков подобной рецептору активина киназы 4 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK4 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK4 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK4 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK4" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ALK4, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK4 полипептидов, описанных в настоящем описании основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK4 человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 26), если нет иных конкретных обозначений.

Каноническая последовательность белка-предшественника ALK4 человека (NCBI Ref Seq NP_004293) является следующей:

```

1 MAESAGASSF FPLVLLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD
61 GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSIDL RNTGCCYTDY CNRIDLRVPS
GHLKEPEHPS
121 MWGPVELVGI IAGPVFLFL I I I I VFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ
181 DLVYDLSTSG SSGGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD
VAVKIFSSRE
241 ERSWFRAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL
FDYLNRYTVT
301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA
IADLGLAVRH
361 DAVTDTIDIA PNQRVGTRKY MAPEVLDETI NMKHFDSFKC ADIYALGLVY
WEIARRCNSG
421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG
KMMRECWYAN
481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (SEQ ID NO: 26)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK4 человека является следующей:

```

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPF
YCLSSIDL RNTGCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO: 27)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK4, показана ниже (SEQ ID NO: 28), и соответствует нуклеотидам 78-1592 справочной последовательности Genbank

NM_004302.4. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTGTGCTCCTGCTCGCCGG
CAGCGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAG
 GCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGG
 AGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTG
 CCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGTACTACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
 TTGAGGGTGCCCAAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCATGTGGGGCCCGTGGAGC
 TGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTTCCTCCTGTTCCTCATCATCATCATTTGTTTTCTTGT
 CATTAACATATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGT
 GAGATGTGTCTCTCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGT
 CTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCGAACCATCGTTTTACAAGAGAT
 TATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGAAGTATGGCGGGCCGCTGGAGGGTGGTGTGTGGCTGTG
 AAAATATTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATACCAGACGGTCA
 TGCTGCCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGATAATGGCACCTGGAC
 ACAGCTGTGGCTTGTTCCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTGTTTATTATCTGAACCGGTAC
 ACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGC
 ACATGGAGATCGTGGGCACCCAAAGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAA
 CATCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTATGAT
 GCAGTCACTGACACCATTGACATTTGCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAACGATACATGGCCC
 CTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTA
 TGCCCTCGGGCTTGATATATGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCGGAGGAGTCCATGAAGAA
 TATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCCAAAGGTTG
 TATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAAGTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGT
 GATGGGGAAGATGATGCGAGAGTGTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCTGACGGCCCTGCCG
 ATCAAGAAGACCCCTCTCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 28)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный полипептид ALK4, является следующей:

TCCGGGCCCCGGGGGTTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCCAA
 CTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCAC
 CATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGA
 GCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGTACTACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAG
 GGTGCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCATGTGGGGCCCGTGGAG (SEQ
 ID NO: 29)

Альтернативная изоформа последовательности белка-предшественника ALK4 человека, изоформа C (NCBI Ref Seq NP_064733.3), является следующей:

1 MAESAGASSF FPLVLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD
 61 **GMEHNVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS**
GHLKEPEHPS
 121 **MWGPVELVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRO RLDMEDPSCE**
MCLSKDKTLQ
 181 **DLVYDLSTSG SGGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD**
VAVKIFSSRE
 241 **ERSWFREAIE YQTVMLRHEN ILGFIAADNK ADCSFLTLPW EVVMVSAAPK**
LRSRLRQYKG
 301 **GRGRARFLFP LNNGTWTQLW LVSDYHEHGS LFDYLNRYTV TIEGMIKLAL**
SAASGLAHLH
 361 **MEIVGTQGKP GIAHRDLKSK NILVKKNGMC AIADLGLAVR HDAVTDTIDI**
AFNQRVGTKR
 421 **YMAPEVLDET INMKHFDSFK CADIYALGLV YWEIARRCNS GGVHEEYQLP**
YYDLVPSDPS
 481 **IEEMRKVVCD QKLRPNIPNW WQSYEALRVM GKMMRECWYA NGAARLTALR**
IKKTLSQLSV
 541 **QEDVKI** (SEQ ID NO: 83)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK4 (изоформа С) является следующей:

SGPRGVQALLCACTSCLOANYTCETDGACMVSI FNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPF
YCLSSSEDLRNTHCCTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO: 84)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK4 (изоформа С), показана ниже (SEQ ID NO: 85), и соответствует нуклеотидам 78-1715 справочной последовательности Genbank NM_020328.3. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTCCCCCTTGTGTGCTCCTGCTCGCCGG
CAGCGGGGGTCCGGGCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAG
GCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGG
AGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTG
CCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGTACTACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
TTGAGGGTGCACGTTGGTCACTCAAGGAGCTGAGCACCCGTCATGTGGGGCCCGGTGGAGC
TGGTAGGCATCATCGCCGGCCGGTGTTCCTCCTGTTCTCATCATCATCATTTTTCCTTGT
CATTAACATATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGT
GAGATGTGTCTCTCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGT
CTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGAT
TATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGTATGTGGCTGTG
AAAATATTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTTCAGGGAAGCAGAGATATACCAGACGGTCA
TGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATGCTGTGACAATAAAGCAGACTGCTCATTCCT
CACATTGCCATGGGAAGTTGTAATGGTCTCTGCTGCCCCCAAGCTGAGGAGCCTTAGACTCCAA
TACAAGGGAGGAAGGGAAGAGCAAGATTTTTATTCCCACTGAATAATGGCACCTGGACACAGC
TGTGGCTTGTCTTCTGACTATCATGAGCACGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGT
GACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCTGTCTAGTGGGTGGCACACCTGCACATG
GAGATCGTGGGCACCCAAAGGGAAGCCTGGAATGTCTCATCGAGACTAAAGTCAAAGAACATTC
TGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGTGTCCGTCATGATGCAGT
CACTGACACCATTGACATTGCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCCTGAA
GTAATTGATGAAACATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTATGCCC
TCGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCA
GCTGCCATATACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTGTATGT
GATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGTATGG
GGAAGATGATGCGAGAGTGTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAA
GAAGACCCTCTCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 85)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный полипептид ALK4 (изоформа С), является следующей:

TCCGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCCAA
CTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCAC
CATGTGCGCACCTGCATCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGA
GCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGTACTACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAG
GGTGCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCATGTGGGGCCCGGTGGAG (SEQ
ID NO: 86)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK4 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK4, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK4). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK4 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99 идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 403 или 404. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят по меньшей мере из одного полипептида ALK4, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 403 или 404.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK5. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK5" относится к семейству белков подобной рецептору активина киназы 5 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK4 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK5 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK5 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK5" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ALK5, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK5 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK5 человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 30), если нет иных конкретных обозначений.

Каноническая последовательность белка-предшественника ALK5 человека (NCBI Ref Seq NP_004603.1) является следующей:

```

1  MEAAVAAPRP  RLLLLVLA  AAAAALLP  G  ATALQCFCHL  CTKDNFTCVT
DGLCFVSVTE
61  TTDKVIHNSM  CIAEIDLIPR  DRPFVCA  PSS  KTGSVTTTYC  CNQDHCNKIE
LPTTVKSSPG
121  LGPVELAAVI  AGPVCFCIS  LMLMVYIC  HN  RTVIHHRV  PN  EEDPSLDRPF
ISEGTTLKDL
181  IYDMTTSGSG  SGLPLLVQRT  IARTIVLQ  ES  IGKGRFGE  VW  RGKWRGEEVA
VKIFSSREER
241  SWFREAEIYQ  TVMLRHENIL  GFIAADNK  DN  GTWTQLWL  VS  DYHEHGS  LFD
YLNRYTVTVE
301  GMIKLALSTA  SGLAHLHMEI  VGTQGKPA  IA  HRDLKSKN  IL  VKKNGTCC  IA
DLGLAVRHDS
361  ATDTIDIAPN  HRVGTKRYMA  PEVLDDSI  NM  KHFESEFK  RAD  IYAMGLV  FEWE
IARRCSIGGI
421  HEDYQLPY  YD  LVPSDPS  VEE  MRKVVC  EQKL  RPNIPNR  WQS  CEALRVMA  KI
MRECWYANGA
481  ARLTALRIKK  TLSQLSQQ  EG  IKM (SEQ ID NO: 30)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK5 является следующей:

```

AALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRP
FVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVEL (SEQ ID NO: 31)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK5, показана ниже (SEQ ID NO: 32), и соответствует нуклеотидам 77-1585 справочной последовательности Genbank NM_004612.2. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGGAGGCGGGCGGTCCGCTGCTCCGCGTCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGGCGGGCGGCGGGCGGGCGGCGCGCTGCTCCCGGGGGGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTACAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAGACAAAGTTATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGTGCACCCCTCTTCAAAAACCTGGGCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAATAAAAATAGAACTCCAACCTACTGTAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCTGTGGAAGTGGCAGTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGCTCTGCATCTCACTCATGTTGATGGTCTATATCTGCCAACCCGCACTGTCATTACCATCGAGTGCCAAATGAAGAGGACCCTTCATTAGATCGCCCTTTTATTTACAGAGGTTACTACGTTGAAAGACTTAATTTATGATATGACAACGTCAGGTTCTGGCTCAGGTTTACCATTGCTTGTTCAGAGAACAATTGCGAGAACAATTGTGTTACAAGAAAGCATTGGCAAAGTTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGAGAAGAAGTTGCTGTTAAGATA TTCTCCTCTAGAGAAGAAGCTTCGTTGTTCCGTGAGGCAGAGATTTATCAAACCTGTAATGTTACGTCATGAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGACAATGGTACTTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGAGATTATCATGAGCATGGATCCCTTTTGTACTTAAACAGATACACAGTTACTGTGGAAGGAATGATAAAAACCTGCTCTGTCCACGGCGAGCGGCTTGCCCATCTTCACATGGAGATTGTTGGTACCCAAGGAAAGCCAGCCATTGCTCATAGAGATTTGAAATCAAAGAATATCTTGGTAAAGAAGAATGGAACCTGCTGTATTGCGAGACTTAGGACTGGCAGTAAGACATGATTCAGCCACAGATACCATTGATATTGCTCCAAACCACAGAGTGGGAACAAAAAGGTACATGGCCCTGGAATTCTCGATGATCCATAAATATGAAACATTTTGAATCCTTCAAACGTGCTGACATCTATGCAATGGGCTTAGTATCTGGGAAATGCTCGACGATGTCCATTGGTGGAAATTCATGAAGATTACCACTGCTTATTATGATCTTGTACCTTCTGACCCATCAGTTGAAGAAATGAGAAAAGTTGTTGTGAACAGAGTTAAGGCCAAATATCCCAAACAGATGCCAGAGCTGTGAAGCCTTGAGAGTAATGGCTAAATATGAGAGAATGTTGGTATGCCAATGGAGCAGCTAGGCTTACAGCATTGGCGATTAAGAAAACATTTACGCAACTCAGTCAACAGGAAGGCATCAAATG (SEQ ID NO: 32)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный полипептид ALK5 человека, является следующей:

GCGGCGTCTCCCGGGGGGCGAGCGGCTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTACAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAGACAAAAGTATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGTGCACCCCTCTTCAAAAACCTGGGCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAATAAATAGAACTCCAACCTACTGTAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCTGTGGAAGTGGCAGTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGCTCTGCATCTCACTCATGTTGATGGTCTATATCTGCCAACCCGCACTGTCATTACCATCGAGTGCCAAATGAAGAGGACCCTTCATTAGATCGCCCTTTTATTTACAGAGGTTACTACGTTGAAAGACTTAATTTATGATATGACAACGTCAGGTTCTGGCTCAGGTTTACCATTGCTTGTTCAGAGAACAATTGCGAGAACAATTGTGTTACAAGAAAGCATTGGCAAAGTTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGAGAAGAAGTTGCTGTTAAGATA TTCTCCTCTAGAGAAGAAGCTTCGTTGTTCCGTGAGGCAGAGATTTATCAAACCTGTAATGTTACGTCATGAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGACAATGGTACTTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGAGATTATCATGAGCATGGATCCCTTTTGTACTTAAACAGATACACAGTTACTGTGGAAGGAATGATAAAAACCTGCTCTGTCCACGGCGAGCGGCTTGCCCATCTTCACATGGAGATTGTTGGTACCCAAGGAAAGCCAGCCATTGCTCATAGAGATTTGAAATCAAAGAATATCTTGGTAAAGAAGAATGGAACCTGCTGTATTGCGAGACTTAGGACTGGCAGTAAGACATGATTCAGCCACAGATACCATTGATATTGCTCCAAACCACAGAGTGGGAACAAAAAGGTACATGGCCCTGGAATTCTCGATGATCCATAAATATGAAACATTTTGAATCCTTCAAACGTGCTGACATCTATGCAATGGGCTTAGTATCTGGGAAATGCTCGACGATGTCCATTGGTGGAAATTCATGAAGATTACCACTGCTTATTATGATCTTGTACCTTCTGACCCATCAGTTGAAGAAATGAGAAAAGTTGTTGTGAACAGAGTTAAGGCCAAATATCCCAAACAGATGCCAGAGCTGTGAAGCCTTGAGAGTAATGGCTAAATATGAGAGAATGTTGGTATGCCAATGGAGCAGCTAGGCTTACAGCATTGGCGATTAAGAAAACATTTACGCAACTCAGTCAACAGGAAGGCATCAAATG (SEQ ID NO: 33)

Альтернативная изоформа последовательности белка-предшественника ALK5 человека, изоформа 2 (NCBI Ref Seq XP_005252207.1), является следующей:

1 MEAAVAAPRP RLLLLVLAAA AAAAAALLPG ATALQCFCHL CTKDNFTCVT
 DGLCFVSVTE
 61 TTDKVIHNSM CIAEIDLIPR DRPFVCPASS KTGSVTTTTYC CNQDHCNKIE
 LPTTGPFVSVK
 121 SSPGLGPVEL AAVIAGPVCF VCISLMLMVY ICHNRTVIHH RVPNEEDPSL
 DRPFISEGTT
 181 LKDLIYDMTT SSGSGLPLL VQRTIARTIV LQESIGKGRF GEVWRGKWRG
 EEVAVKIFSS
 241 REERSWFREA EIYQTVMLRH ENILGFIAAD NKDNGTWTQL WLVS DYHEHG
 SLFDYLNRYT
 301 VTVEGMIKLA LSTASGLAHL HMEIVGTQ GK PAIAHRDLKS KNILVKKNGT
 CCIADLGLAV
 361 RHDSATDTID IAPNHRVGTK RYMAPEVLDD SINMKHFESF KRADIYAMGL
 VFWEIARCS
 421 IGGIHEDYQL PYYDLVPSDP SVEEMRKVVC EQKLRPNIPN RWQSCEALRV
 MAKIMRECWY
 481 ANGAARLTAL RIKKTLSQLS QQEGIKM (SEQ ID NO: 87)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK5 (изоформа 2) является следующей:

AALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRDRPFVCPASSKTVSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFVSVKSSPGLGPVEL (SEQ ID NO: 88)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK5 человека (изоформа 2) показан ниже (SEQ ID NO: 89), и соответствует нуклеотидам 77-1597 справочной последо-

вательности Genbank XM_005252150.1. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGGAGGGGGCGGTTCGCTGCTCCGCGTCCCGGGCTGCTCCTCCTCGTGGTGGCGGGCGG
GGCGGGGGGGCGCGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGT
 ACAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAG
 ACAAAGTTATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTT
 TGTATGTGCACCCTCTTCAAAAACSTGGTCTGTGACTACAACATATGCTGCAATCAGGACCAT
 TGCAATAAAATAGAACTTCCAACACTACTGGCCSTTTTTCAGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTC
 CTGTGGAACSTGGCAGCTGTCAATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGCTCTGCATCTCACTCATGTTGAI
 GGTCTATATCTGCCACAACCGCACTGTCAATCACCATCGAGTGCCTAAATGAAGAGGACCTTCA
 TTAGATCGCCCTTTTATTTTCCAGAGGGTACTACGTTGAAAGACTTAATTTATGATATGACAACGT
 CAGGTTCTGGCTCAGGTTTACCATTGCTTGTTCAGAGAACAATTCGAGAACTATTGTGTACA
 AGAAAGCATTGGCAAAGGTCGATTTGGAGAAGTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGAGAAGAAGTT
 GCTGTTAAGATATTCTCCTCTAGAGAAGAACGTTCTGTTCCGTGAGGCGAGAGATTTATCAAA
 CTGTAATGTTACGTCATGAAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGACAATGGTAC
 TTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGATTTATCATGAGCATGGATCCCTTTTGTACTTAAAC
 AGATACACAGTTACTGTGGAAGGAATGATAAAACTTGTCTGTCCACGGCGAGCGGCTTGGCCC
 ATCTTCACATGGAGATTGTTGGTACCCAAGGAAAGCCAGCCATTGCTCATAGAGATTTGAAATC
 AAAGAATATCTTGGTAAAGAAGAATGGAACCTGCTGTATTGCGAGACTTAGGACTGGCAGTAAGA
 CATGATTCAGCCACAGATACCAATTGATATTGCTCCAACCACAGAGTGGGAACAAAAAGGTACA
 TGGCCCTGAAGTCTCGATGATTCATAAATATGAAACATTTTGAATCCTTCAAACGTGCTGA
 CATCTATGCAATGGGCTTAGTATTCTGGGAAATGCTCGACGATGTTCCATTGGTGGAAATCAT
 GAAGATTACCAACTGCCTTATTATGATCTTGTACCTTCTGACCCATCAGTTGAAGAAATGAGAA
 AAGTTGTTTGTGAACAGAAGTTAAGGCCAAATATCCCAAACAGATGGCAGAGCTGTGAAGCCTT
 GAGAGTAATGGCTAAAATATGAGAGAATGTTGGTATGCCAATGGAGCAGCTAGGCTTACAGCA
 TTGGCGGATTAAGAAAACATTTATCGCAACTCAGTCAACAGGAAGGCATCAAAATG (SEQ ID
 NO: 89)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный полипептид ALK5, является следующей:

CGGGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTCAGTGTTCCTGCCACCTCTGTACAAAAGA
 CAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAGACAAGTT
 ATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGTG
 CACCTCTTCAAAAACSTGGTCTGTGACTACAACATATGCTGCAATCAGGACCATTCGAATAA
 AATAGAACTTCCAACACTACTGGCCSTTTTTCAGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCTGTGGAA
 CTG (SEQ ID NO: 90)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK5 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK5, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK5). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK5 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активности (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, 31, 87 или 88. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят по меньшей мере из одного полипептида ALK5, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, 31, 87 или 88.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK6. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK6" относится к белкам семейства подобной рецептору активина киназы 6 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK6 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK6 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK6 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK6" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе

полипептид представителя семейства ALK6, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK6 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK6 человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 34), если нет иных конкретных обозначений.

Каноническая последовательность белка-предшественника ALK6 человека (NCBI Ref Seq NP_001194.1) является следующей:

```

1  MLLRSAGKLN VGTKKEDGES TAPTTPRPKVL RCKCHHHCP DSVNNICSTD
GYCFTMIEED
61  DSGLPVVTSG CLGLEGSDFQ CRDTPIPHQR RSIECCTERN ECNKDLHPTL
PPLKNRDFVD
121 GPIHHRALLI SVTVCSLLLV LIILFCYFRY KRQETRPRYS IGLEQDETYI
PPGESLRDLI
181 EQSQSSGSGS GLPLLVRTI AKQIQMVQI GKGRYGEVVM GKWRGEKVAV
KVFFTTTEAS
241 WFRETEIYQT VLMRHENILG FIAADIKGTG SWTQLYLITD YHENGSLYDY
LKSTTLDAKS
301 MLKLAYSSVS GLCHLHTEIF STQGKPAIAH RDLKSKNILV KKNGTCCIAD
LGLAVKFISD
361 TNEVDIPPNT RVGTRKRYMP EVLDESLNRN HFQSYIMADM YSFGLILWEV
ARRCVSGGIV
421 EEYQLPYHDL VPSDPSYEDM REIVCIKKLR PSFPNRWSSD ECLRQMGKLM
TECWAHNPAS
481 RLTALRVKKT LAKMSESQDI KL (SEQ ID NO: 34)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK6 является следующей:

```

KKEDGESTAPTTPRPKVLRCCKCHHHCPEDSVNNICSTDGYCFTMIEEDDSGLPVVTSGCL
GLEGSDFQCRDTPIPHQRRSIECCTERNECNKDLHPTLPPLKNRDFVDGPIHHR (SEQ ID
NO: 35)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK6, показана ниже (SEQ ID NO: 36), и соответствует нуклеотидам 275-1780 справочной последовательности Genbank NM_001203.2. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGCTTTTGCGAAGTGCAGGAAAATTAAATGTGGGCACCAAGAAAGAGGATGGTGAGAG
TACAGCCCCACCCCCCGTCCAAAGGTCTTGCCTGTAAATGCCACCACCATTGTCCAGAAGAC
TCAGTCAACAATATTTGCAGCACAGACGGATATTGTTTCACGATGATAGAAGAGGATGACTCTG
GGTTGCCTGTGGTCACCTCTGGTTGCCTAGGACTAGAAGGCTCAGATTTTCAGTGTGGGACAC
TCCCATTCCATCAAGAAGATCAATTGAATGCTGCACAGAAAGGAACGAATGTAATAAAGAC
CTACACCCTACACTGCCTCCATTGAAAAACAGAGATTTTGTGATGGACCTATACACCACAGGG
CTTTACTTATATCTGTGACTGTCTGTAGTTTGTCTTGGTCCCTTATCATATATTTTGTACTT
CCGGTATAAAAGACAAGAAACCAGACCTCGATACAGCATTGGGTTAGAACAGGATGAAACTTAC
ATTCCCTCTGGAGAATCCCTGAGAGACTTAATTGAGCAGTCTCAGAGCTCAGGAAGTGGATCAG
GCCTCCCTCTGCTGGTCCAAAGGACTATAGCTAAGCAGATTCAGATGGTGAACAGATTGGAAA
AGGTCGCTATGGGGAAGTTTGGATGGGAAAGTGGCGTGGCGAAAAGGTAGCTGTGAAAGTGTTC
TTCACCACAGAGGAAGCCAGCTGGTTCAGAGAGACAGAAATATATCAGACAGTGTGATGAGGC
ATGAAAACATTTTGGTTTCATTGCTGCAGATATCAAAGGGACAGGGTCCCTGGACCAGTTGTA
CCTAATCACAGACTATCATGAAAATGGTCCCTTTATGATTATCTGAAGTCCACCACCCTAGAC
GCTAAATCAATGCTGAAGTTAGCCTACTCTTCTGTGCTGAGTGGCTTATGTCATTTACACACAGAAA
TCTTTAGTACTCAAGGCAAACCAGCAATTGCCCATCGAGATCTGAAAAGTAAAAACATCTGGT
GAAGAAAATGGAAGTTGCTGTATTGCTGACCTGGGCCTGGCTGTTAAATTTATTAGTGATACA
AATGAAGTTGACATACCACCTAACACTCGAGTTGGCACCACGCTATATGCCTCCAGAAGTGT
TGGACGAGAGCTTGAACAGAAATCACTTCCAGTCTTACATCATGGCTGACATGTATAGTTTGG
CCTCATCCTTTGGGAGTTGCTAGGAGATGTGTATCAGGAGGTATAGTGAAGAATACCAGCTT
CCTTATCATGACCTAGTGCCAGTGACCCCTTATGAGGACATGAGGGAGATTGTGTGCATCA
AGAAGTTACGCCCTCATTTCCAAACCGGTGGAGCAGTGATGAGTGTCTAAGGCAGATGGGAAA
ACTCATGACAGAATGCTGGGCTCACAATCCTGCATCAAGGCTGACAGCCCTGCGGGTTAAGAAA
ACACTTGCCAAAATGTCAGAGTCCCAGGACATTAACCTC (SEQ ID NO: 36)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный поли-
пептид ALK6, является следующей:

AAGAAAAGAGGATGGTGAGAGTACAGCCCCACCCCCCGTCCAAAGGTCTTGCCTGTAA
ATGCCACCACCATTGTCCAGAAGACTCAGTCAACAATATTTGCAGCACAGACGGATATTGTTTC
ACGATGATAGAAGAGGATGACTCTGGGTGCCTGTGGTCACTTCTGGTTGCCTAGGACTAGAAG
GCTCAGATTTTCAGTGTGGGACACTCCCATTCCATCAAGAAGATCAATTGAATGCTGCAC
AGAAAGGAACGAATGTAATAAAGACCTACACCCTACACTGCCTCCATTGAAAAACAGAGATTTT
GTTGATGGACCTATACACCACAGG (SEQ ID NO: 37)

Альтернативная изоформа последовательности белка-предшественника ALK6 человека, изоформа 2
(NCBI Ref Seq NP_01243722.1) является следующей:

1 MGWLEELNWQ LHFLLILLS MHTRANFLDN MLLRSAGKLN VGTKKEDGES
TAPTRPKVL
61 RCKCHNHCP E DSVNNICSTD GYCFTMIEED DSGLPVVTSG CLGLEGSDFQ
CRDTPIPHQR
121 RSIECCTERN E CNKDLHPTL PPLKNRDFVD GPIHHRALLI SVTVCSLLL
LILFCYFRY
181 KRQETRPYS I GLEQDETYI PPGESLRDLI EQSSSGSGS GLPLLVQRTI
AKQIQMVKQI
241 GKGRYGEVWM GKWRGEKVAV KVFFTTEEAS WFRETEIYQT VLMRHENILG
FIAADIKGTG
301 SWTQLYLITD YHENGSLYDY LKSTTLDAKS MLKLAYSVS GLCHLHTEIF
STQGKPAIAH
361 RDLKSKNILV KKNGTCCIAD LGLAVKFISD TNEVDIPPNT RVGTRKRYMPP
EVLDESLNRN
421 HFQSYIMADM YSFGLILWEV ARRCVSGGIV EEYQLPYHDL VPSDPSYEDM
REIVCIKKLR
481 PSFPNRWSSD ECLRQMGKLM TECWAHPAS RLTAALRVKKT LAKMSSEQDI
KL (SEQ ID NO: 91)

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужир-

ным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида ALK6 (изоформа 2) является следующей:

NFLDNMLLSAGKLNVTGKEDGESTAPTRPKVLRCKCHHNCPEDSVNNICSTDGYCF
 TMIEEDDSGLPVVTSGLGLEGSDFQCRDTPIPHQRRSIECCTERNECNKDLHPTLPLKNRDF
 VDGPINHR (SEQ ID NO: 92)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ALK6 человека (изоформа 2), показана ниже и соответствует нуклеотидам 22-1617 справочной последовательности Genbank NM_001256793.1. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGGGTTGGCTGGAAGAAACTAAACTGGCAGCTTCACATTTTCTTGCTCATTCTTCTCTC
TATGCACACAAGGGCAAACTTCSTTGATAACATGCTTTTGCGAAGTGCAGGAAAATAAATGTG
GGCACCAAGAAAGAGGATGGTGAGAGTACAGCCCCACCCCCGTCCAAAGGTCTTGCCTGTGA
AATGCCACCACCATTGTCCAGAAGACTCAGTCAACAATAATTTGCAGCACAGACGGATATTGTTT
CACGATGATAGAAGAGGATGACTCTGGGTTGCCTGTGGTCACTTCTGGTTGCCTAGGACTAGAA
GGCTCAGATTTTTCAGTGTCTGGGACACTCCCATTCCTCATCAAAGAAGATCAATTGAATGCTGCA
CAGAAAGGAACGAATGTAATAAAGACCTACACCCTACACTGCCTCCATTGAAAAACAGAGATTT
TGTTGATGGACCTATACACCACAGGCTTTACTTATATCTGTGACTGTCTGTAGTTTGTCTTTG
GTCTTATCATATTTATTTTGTACTTCCGGTATAAAAGACAAGAAACCAGACCTCGATACAGCA
TTGGGTTAGAACAGGATGAAACTTACATTCCTCCTGGAGAATCCCTGAGAGACTTAATTGAGCA
GTCTCAGAGCTCAGGAAGTGGATCAGGCCCTCCCTCTGCTGGTCCAAAGGACTATAGCTAAGCAG
ATTCAGATGGTGAACAGATTGGAAGGTCGCTATGGGGAAGTTTGGATGGGAAAGTGGCGTG
GCGAAAAGGTAGCTGTGAAAGTGTCTTACCACAGAGGAAGCCAGCTGGTTCAGAGAGACAGA
AATATATCAGACAGTGTGATGAGGCATGAAAACATTTTGGGTTTCATTGCTGCAGATATCAA
GGGACAGGGTCCCTGGACCCAGTTGTACCTAATCACAGACTATCATGAAAATGGTTCCTTTATG
ATTATCTGAAGTCCACCACCTAGACGCTAAATCAATGCTGAAGTTAGCCTACTCTTCTGTCTCAG
TGGCTTATGTCAATTTACACACAGAAATCTTTAGTACTCAAGGCAAACCAGCAATTGCCCATCGA
GATCTGAAAAGTAAAACATTTCTGGTGAAGAAAATGGAACCTGCTGTATTGCTGACCTGGGCC
TGGCTGTAAATTTATAGTGATACAAATGAAGTTGACATACCACCTAACACTCGAGTTGGCAC
CAAACGCTATATGCCTCCAGAAGTGTGGACGAGAGCTTGAACAGAAATCACTTCCAGTCTTAC
ATCATGGCTGACATGTATAGTTTGGCCTCATCCTTTGGGAGGTTGCTAGGAGATGTGTATCAG
GAGGTATAGTGAAGAATACCAGCTTCCTTATCATGACCTAGTGCCAGTGACCCCTCTTATGA
GGACATGAGGGAGATTGTGTGCATCAAGAAGTTACGCCCCCATTCCCAAACCGGTGGAGCAGT
GATGAGTGTCTAAGGCAGATGGGAAAACCTCATGACAGAATGCTGGGCTCACAACTCTGCATCAA
GGCTGACAGCCCTGCGGGTTAAGAAAACACTTGCCAAAATGTCAGAGTCCCAGGACATTAACAT
 C (SEQ ID NO: 93)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный полипептид ALK6, является следующей:

AACTTCSTTGATAACATGCTTTTGCGAAGTGCAGGAAAATAAATGTGGGCACCAAGAA
AGAGGATGGTGAGAGTACAGCCCCACCCCCGTCCAAAGGTCTTGGCTGTAAATGCCACCAC
CATTGTCCAGAAGACTCAGTCAACAATAATTTGCAGCACAGACGGATATTGTTTCACGATGATAG
AAGAGGATGACTCTGGGTTGCCTGTGGTCACTTCTGGTTGCCTAGGACTAGAAGGCTCAGATTT
TCAGTGTCTGGGACACTCCCATTCCTCATCAAAGAAGATCAATTGAATGCTGCACAGAAAGGAAC
GAATGTAATAAAGACCTACACCCTACACTGCCTCCATTGAAAAACAGAGATTTTGTGATGGAC
 CTATACACCACAGG (SEQ ID NO: 94)

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK6 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK6, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK6). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK6 для применения в соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, 35, 91 или 92. В

некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят по меньшей мере из одного полипептида ALK6, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, 35, 91 или 92.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK7. Как используют в рамках изобретения, термин "ALK7" относится к семейству белков подобной рецептору активина киназы 7 любого вида и к вариантам, происходящим из таких белков ALK7 посредством мутагенеза или другой модификации. Указание на ALK7 в настоящем описании следует понимать как указание на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства ALK7 в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена со спрогнозированной активностью серин/треониновой киназы.

Термин "полипептид ALK7" включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид представителя семейства ALK7, а также любые их варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и формы пептидомиметиков), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK7 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK7 человека, показанной ниже (SEQ ID NO: 38), если нет иных конкретных обозначений.

Описано четыре встречающихся в природе изоформы ALK7 человека. Последовательность изоформы 1 канонического белка-предшественника ALK7 человека (NCBI Ref Seq NP_660302.2) является следующей:

```

1  MTRALCSALR  QALLLLAAAA  ELSPLKVCV  LLCSSNFTC  QTEGACWASV
MLTNGKEQVI
61  KSCVSLPELN  AQVFCHSSNN  VTKTECCFTD  FCNNITLHLP  TASPNAPKLG
PMELAIITV
121 PVCLLSIAAM  LTVWACQGRQ  CSYRKKRPN  VEEPLSECNL  VNAGKTLKDL
IYDVTASGSG
181 SGLPLLQRT  IARTIVLQEI  VGKGRFGEVW  HGRWCGEDVA  VKIFSSRDER
SWFREAEIYQ
241 TVMLRHENIL  GFIAADNKDN  GTWTQLWLV  EYHEQGSLYD  YLNRNIVTVA
GMIKLALSIA
301 SGLAHLHMEI  VGTQGKPAIA  HRDIKSKNIL  VKKCECAIA  DLGLAVKHDS
ILNTIDIPQN
361 PKVGTKRYMA  PEMLDDTMNV  NIFESFKRAD  IYSVGLVYWE  IARRCSVGGI
VEEYQLPYD
421 MVPSDPSIEE  MRKVCDQKF  RPSIPNQWQS  CEALRVMGRI  MRECWYANGA
ARLTALRIKK
481 TISQLCVKED  CKA (SEQ ID NO: 38)

```

Сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

Последовательность процессированного внеклеточного полипептида изоформы 1 ALK7 является следующей:

```

ELSPGLKCVCLLCSSNFTCQTEGACWASVMLTNGKEQVIKSCVSLPELNAQVFCHSSN
NVTKTECCFTDFCNNITLHLP TASP NAPKLG PME (SEQ ID NO: 39)

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник изоформы 1 ALK7 человека, показана ниже (SEQ ID NO: 40), и соответствует нуклеотидам 244-1722 справочной последовательности Genbank NM_145259.2. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

ATGACCCGGGCGCTCTGCTCAGCGCTCCGCCAGGCTCTCCTGCTGCTCGCAGCGGCCG
CGAGCTCTGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTTTACCTGCCAA
 ACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCT
 GTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTCTAGTTCCAACAATGTTACCAAAAC
 CGAATGCTGCTTACAGATTTTGGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCACCAAAT
 GCCCCAAAACCTGGACCCATGGAGCTGGCCATCATTATTACTGTGCCTGTTTGCCTCCTGTCCA
 TAGCTGCGATGCTGACAGTATGGGCATGCCAGGTCGACAGTGTCTTACAGGAAGAAAAAGAG
 ACCAAATGTGGAGGAACCACTCTCTGAGTGAATCTGGTAAATGCTGGAAAACTCTGAAAGAT
 CTGATTTATGATGTGACCGCTCTGGATCTGGCTCTGGTCTACCTCTGTTGGTTCAAAGGACAA
 TTGCAAGGACGATTTGTCTCAGGAAATAGTAGGAAAAGGTAGATTTGGTGAGGTGTGGCATGG
 AAGATGGTGTGGGAAGATGTGGCTGTGAAAATATTTCTCCTCCAGAGATGAAAGATCTTGGTTT
 CGTGAGGCAGAAATTTACCAGACGGTCATGCTGCGACATGAAAACATCCTTGGTTTCATTGCTG
 CTGACAACAAAGATAATGGAACCTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGG
 CTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTC
 TCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTA
 TTGCTCATCGAGACATAAAATCAAAGAATATCTTAGTAAAAAGTGTGAACTTGTGCCATAGC
 GGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCT
 AAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCT
 TTGAGTCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGGAG
 GTGTTTCAGTCGGAGGAATTTGTTGAGGAGTACCAATGCCTTATATGACATGGTGCCTTCAGAT
 CCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGTTGTTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACC
 AGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGTGATGTTGGTATGCCAA
 CGGAGCGGCCCGCTAACTGCTCTTCTGATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAA
 GACTGCAAAGCC (SEQ ID NO: 40)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный поли-
 пептид ALK7 (изоформа 1) является следующей:

GAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTTTACCTG
 CCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAA
 TCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTCTAGTTCCAACAATGTTACCA
 AAACCGAATGCTGCTTACAGATTTTGGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCAC
 AAATGCCCCAAAACCTGGACCCATGGAG (SEQ ID NO: 41)

Аминокислотная последовательность альтернативной изоформы ALK7 человека, изоформы 2
 (NCBI Ref Seq NP_001104501.1), показана в ее процессированной форме ниже (SEQ ID NO: 301), где
 внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.

1 MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
TASPNAPKLG
 61 **PMELAIITV** PVCLLSIAAM LTVWACQGRQ CSYRKKRPN VEEPLSECNL
 VNAGKTLKDL
 121 IYDVTASGSG SGLPLLVRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA
 VKIFSSRDER
 181 SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKN GTWTQLWLV EYHEQGSLYD
 YLNRNIVTVA
 241 GMIKLALSIA SGLAHLHMEI VGTQKPAIA HRDIKSKNIL VKKCTCAIA
 DLGLAVKHDS
 301 ILNTIDIPQN PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD IYSVGLVYWE
 IARRCSVGGI
 361 VEEYQLPYD MVPSPSIEE MRKVCDQKF RPSIPNQWS CEALRVMGRI
 MRECWYANGA
 421 ARLTALRIKK TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 301)

Аминокислотная последовательность внеклеточного полипептида ALK7 (изоформа 2) является сле-
 дующей:

MLTNGKEQVIKSCVSLPELNAQVFCHSSNNVTKTECCFTDFCNNITLHLP**TASPNAPKL**
 GPME (SEQ ID NO: 302).

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный полипептид ALK7
 (изоформа 2) показана ниже (SEQ ID NO: 303) и соответствует нуклеотидам 279-1607 справочной после-

довательности NCBI NM_00111031.1. Внеклеточный домен указан полужирным шрифтом.
ATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCSTTCCAGAACTGAA

TGCTCAAGTCTTCTGTTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTT
TGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCACCAAATGCCCCAAAACCTGGACCCATGG
AGCTGGCCATCATTATTACTGTGCCTGTTTGCCTCCTGTCCATAGCTGCGATGCTGACAGTATG
GGCATGCCAGGGTCGACAGTGCCTACAGGAAGAAAAGAGACCAAATGTGGAGGAACCACTC
TCTGAGTGCATCTGGTAAATGCTGGAAAACCTCTGAAAGATCTGATTTATGATGTGACCGCCT
CTGGATCTGGCTCTGGTCTACCTCTGTTGGTTCAAAGGACAATTGCAAGGACGATGTGTCTTCA
GGAAATAGTAGGAAAAGGTAGATTTGGTGGGTGTGGCATGGAAGATGGTGTGGGGAAGATGTG
GCTGTGAAAATATCTCCTCCAGAGATGAAAGATCTTGGTTTCGTGAGGCAGAAATTTACCAGA
CGGTCATGCTGCGACATGAAAACATCCTTGGTTTCATTGCTGCTGACAACAAAGATAATGGAAC
TTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAAT
AGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCAC
ACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAATC
AAAGAATATCTTAGTGAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAG
CATGATTCAAACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATA
TGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCTTTGAGTCTTCAAACGAGCTGA
CATCTATCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGAGGTTCAGTTCGGAGGAATGTT
GAGGAGTACCAATTGCCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAA
AGGTTGTTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACT
CCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGTGTTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCCTAACTGCT
CTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCC (SEQ ID
NO: 303)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный полипептид ALK7 (изо-
форма 2) является следующей (SEQ ID NO: 304):

ATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCSTTCCAGAACTGAA
TGCTCAAGTCTTCTGTTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTT
TGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCACCAAATGCCCCAAAACCTGGACCCATGG
AG (SEQ ID NO: 304)

Аминокислотная последовательность альтернативного белка-предшественника ALK7 человека,
изоформа 3 (NCBI Ref Seq NP_001104502.1), показана ниже (SEQ ID NO: 305), где сигнальный пептид
указан однократным подчеркиванием.

1 MTRALCSALR QALLLLAAA ELSPLKVC LLCSSNFTC QTEGACWASV
MLTNGKEQVI
61 KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TGLPLLVQRT
IARTIVLQEI
121 VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA VKIFSSRDER SWFREAEIQ TVMLRHNIL
GFIAADNKDN
181 GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD YLNRNIVTVA GMIKLALSIA SGLAHLHMEI
VGTQ GKPAIA
241 HRDIKSKNIL VKKETCAIA DLGLAVKHDS ILNTIDIPQN PKVGTKRYMA
PEMLDDTMNV
301 NIFESFKRAD IYSVGLVYWE IARRCSVGGI VEEYQLPYD MVPSDPSIEE
MRKVVDQKF
361 RPSIPNQWS CEALRVMGRI MRECWYANGA ARLTALRIKK TISQLCVKED
CKA (SEQ ID NO: 305)

Аминокислотная последовательность процессированного полипептида ALK7 (изоформа 3) является
следующей (SEQ ID NO: 306). Эта изоформа лишена трансмембранного домена и, таким образом, пред-
положительно является растворимой целиком (Roberts et al., 2003, Biol Reprod 68:1719-1726). N-концевые
варианты SEQ ID NO: 306 спрогнозированы, как описано ниже.

1 ELSPLKVCV LLCSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN
 AOVFCHSSNN
 61 VTKTECCFTD FCNNITLHLP TGLPLLVRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW
 HGRWCGEDVA
 121 VKIFSSRDER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS
 EYHEQGSLYD
 181 YLNRNIVTVA GMIKLALSIA SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDIKSKNIL
 VKKCTCAIA
 241 DLGLAVKHDS ILNTIDIPQN PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD
 IYSVGLVYWE
 301 IARRCSVGGI VEEYQLPYD MVRSDPSIEE MRKVVCQKF RPSIPNQWS
 CEALRVMGRI
 361 MRECWYANGA ARLTALRIKK TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 306)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей непротессированный белок-предшественник ALK7 (изоформа 3) показана ниже (SEQ ID NO: 307), и соответствует нуклеотидам 244-1482 справочной последовательности NCBI NM_001111032.1. Сигнальная последовательность указана подчеркиванием.

ATGACCCGGGCGCTCTGCTCAGCGCTCCGCCAGGCTCTCCTGCTGCTCGCAGCGGCCCGC
CGAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACCTTACCTGCCAA
 ACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCT
 GTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTATAGTTCCAAACAATGTTACCAAAAC
 CGAATGCTGCTTACAGATTTTGAACAACATAACTGCACCTTCCAACAGGTCTACCTCTG
 TTGGTTCAAAGGACAATTGCAAGGACGATTGTGCTTCAGGAAATAGTAGGAAAAGGTAGATTTG
 GTGAGGTGTGGCATGGAAGATGGTGTGGGAAGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTCCAGAGA
 TGAAAGATCTTGGTTTCGTGAGGCAGAAATTTACCAGACGGTCATGCTGCGACATGAAAACATC
 CTTGGTTTCATGTGCTGCTGACAACAAGATAATGGAACCTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTG
 AATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAAT
 GATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACA
 CAAGGTAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTG
 AAACCTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGA
 CATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACA
 ATGAATGTGAATATCTTTGAGTCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACT
 GGGAAATAGCCCGGAGGTGTTCAAGTCCGAGGAATGTTGAGGAGTACCAATTGCCTTATTATGA
 CATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTGTTTGTGACCAGAAGTTTCGA
 CCAAGTATCCCAAACAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTG
 AGTGTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCCTAACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCA
 ACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCC (SEQ ID NO: 307)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая протессированный полипептид ALK7 (изоформа 3) является следующей (SEQ ID NO: 308):

GAGCTCTCGCCAGGACTGAAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACCTTACCTG
 CCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAA
 TCCTGTGTCTCCCTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTTCATAGTTCCAACAATGTTACCA
 AAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTTTGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGGTCTACC
 TCTGTTGGTTCAAAGGACAATTGCAAGGACGATTGTGCTTCAGGAAATAGTAGGAAAAGGTAGA
 TTTGGTGAGGTGTGGCATGGAAGATGGTGTGGGGAAGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCCTCCA
 GAGATGAAAGATCTTGGTTTCGTGAGGCAGAAAATTTACCAGACGGTCATGTGCGACATGAAAA
 CATCCTTGGTTTCATTGCTGCTGACAACAAAGATAATGGAACCTGGACTCAACTTTGGCTGGTA
 TCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACCGTGGCTG
 GAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCATATGGAGATTGTTGG
 TACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAAATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAG
 TGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTA
 TCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGA
 TACAATGAATGTGAATATCTTTGAGTCCCTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTT
 TACTGGGAAATAGCCCGGAGGTGTTTCAGTCGGAGGAATGTTTGAGGAGTACCAATTGCCTTATT
 ATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTTGTTTGTGACCAGAAGTT
 TCGACCAAGTATCCCAAACAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATG
 CGTGAGTGTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCTAACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATAT
 CTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCC (SEQ ID NO: 308)

Аминокислотная последовательность альтернативного белка-предшественника ALK7 человека, изоформа 4 (NCBI Ref Seq NP_001104503.1), показана ниже (SEQ ID NO: 309), где сигнальный пептид указан однократным подчеркиванием.

1 MTRALCSALR QALLLLAAAA ELSPGLKVC LLCSSNFTC QTEGACWASV
 MLTNGKEQVI
 61 KSCVSLPELN AQVFCSSNN 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:
 309)

Аминокислотная последовательность процессированного полипептида ALK7 (изоформа 4) является следующей (SEQ ID NO: 310). Подобно изоформе 3 ALK7, изоформа 4 лишена трансмембранного домена и, таким образом, предположительно растворима целиком (Roberts et al., 2003, Biol Reprod 68:1719-1726). N-концевые варианты SEQ ID NO: 310 спрогнозированы, как описано ниже.

1 ELSPGLKVC LLCSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN
 AQVFCSSNN
 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: 310)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей непроецированный белок-предшественник ALK7 (изоформа 4) показана ниже (SEQ ID NO: 311) и соответствует нуклеотидам 244-1244 справочной последовательности NCBI NM_001111033.1.

Сигнальная последовательность указана подчеркиванием.

ATGACCCGGGCGCTCTGCTCAGCGCTCCGCCAGGCTCTCCTGCTGCTCGCAGCGGCCGC
CGAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACCTTTACCTGCCAA
 ACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGAAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCT
 GTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTATAGTTCCAACAATGTTACCAAAAC
 CGAATGCTGCTTACAGATTTTTGCAACAACATAAACACTGCACCTTCCAACAGATAATGGAAC
 TGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATA
 GAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACA
 CCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATGCTCATCGAGACATAAAATCA
 AAGAAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGC
 ATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATAT
 GGCCTCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCTTTGAGTCTTCAAACGAGCTGAC
 ATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGAGGTGTTTCAGTCGGAGGAATTGTTG
 AGGAGTACCAATTGCCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAA
 GGTGTTTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTC
 CGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCTAACTGCTC
 TTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCCTAA (SEQ ID
 NO: 311)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный полипептид ALK7 (изоформа 4) является следующей (SEQ ID NO: 312):

GAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACCTTTACCTG
 CCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGAAAAAGAGCAGGTGATCAA
 TCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTATAGTTCCAACAATGTTACCA
 AAACCGAATGCTGCTTACAGATTTTTGCAACAACATAAACACTGCACCTTCCAACAGATAATGG
 AACTTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTG
 AATAGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGG
 CACACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATGCTCATCGAGACATAAA
 ATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTG
 AAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGT
 ATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCTTTGAGTCTTCAAACGAGC
 TGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGAGGTGTTTCAGTCGGAGGAATT
 GTTGAGGAGTACCAATTGCCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGA
 GAAAGGTTGTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACAGTGGCAAAGTTGTGAAGC
 ACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCTAACT
 GCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCCTAA
 (SEQ ID NO: 312)

Исходя из сигнальной последовательности полноразмерного ALK7 (изоформа 1) у крысы (см. справочную последовательность NCBI NP_620790.1) и из высокой степени идентичности последовательностей между ALK7 человека и крысы, спрогнозировано, что процессированная форма изоформы 1 ALK7 человека 1 является следующей (SEQ ID NO: 313).

1 LKCVCLLCDS SNFTCQTEGA CWASVMLTNG KEQVIKSCVS LPELNAQVFC
 HSSNNVTKTE

61 CCFTDFCNNI TLHLPTASPN APKLGPM (SEQ ID NO: 313)

Спрогнозированы активные варианты процессированной изоформы 1 ALK7, в которых SEQ ID NO: 39 укорочена на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот на N-конце и SEQ ID NO: 313 укорочена на 1 или 2 аминокислоты на N-конце. В соответствии с SEQ ID NO: 313, кроме того, ожидается, что лейцин представляет собой N-концевую аминокислоту в процессированных формах изоформы 3 ALK7 человека (SEQ ID NO: 306) и изоформы 4 ALK7 человека (SEQ ID NO: 310).

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гетеромультимерным комплексам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно полипептиды ALK7 для применения в соответствии с настоящим изобретением (например, гетеромультимерные комплексы, содержащие полипептид ALK7, и их применение) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ALK7 для применения в

соответствии с изобретением связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, 39, 112, 114, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 405 или 406. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по изобретению состоят или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида ALK7, который по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, 39, 112, 114, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 405 или 406.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых

вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислоты 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK5:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK5:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид

ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислоты 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислоты 62-132 SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK6:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK6 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK6 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK6:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислоты 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 и 309. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB по изобретению не содержат кислотной аминокислоты (например, встречающаяся в природе аминокислота D или E или искусственная кислотная аминокислота).

Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK7:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK7 и/или ActRIIB). В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK7 и ActRIIB). Гетеромультимерные комплексы ALK7:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и

другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислоты 30-110 SEQ ID NO: 9. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ActRIIA по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ActRIIA). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIA по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ActRIIA по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ActRIIA). Гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIA по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:ActRIIA по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислоты 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:ActRIIA по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ActRIIA). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIA по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ActRIIA по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ActRIIA). Гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIA по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:ActRIIA по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты,

функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислоты 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9.

Предпочтительно гетеромультимеры ALK3:ActRIIA по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или ActRIIA). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIA по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ActRIIA по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и ActRIIA). Гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIA по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:ActRIIA по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислоты 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. Предпочтительно гетеромультимеры ALK4:ActRIIA по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или ActRIIA). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIA по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIA по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и ActRIIA). Гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIA по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIA по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ActRIIA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислоты 36-106

SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ActR1IA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. Предпочтительно гетеромультимеры ALK5:ActR1IA по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или ActR1IA). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:ActR1IA по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ActR1IA по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и ActR1IA). Гетеромультимерные комплексы ALK5:ActR1IA по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:ActR1IA по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ActR1IA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислоты 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислоты 62-132 SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ActR1IA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. Предпочтительно гетеромультимеры ALK6:ActR1IA по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK6 и/или ActR1IA). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:ActR1IA по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ActR1IA по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK6 и ActR1IA). Гетеромультимерные комплексы ALK6:ActR1IA по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:ActR1IA по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:ActR1IA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислоты 28-93 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:ActR1IA по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActR1IA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательно-

стей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. Предпочтительно гетеромультимеры ALK7:ActR11A по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK7 и/или ActR11A). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:ActR11A по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:ActR11A по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK7 и ActR11A). Гетеромультимерные комплексы ALK7:ActR11A по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:ActR11A по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBR11, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:TGFBR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:TGFBR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR11, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK1:TGFBR11 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или TGFBR11). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:TGFBR11 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:TGFBR11 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и TGFBR11). Гетеромультимерные комплексы ALK1:TGFBR11 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:TGFBR11 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBR11, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:TGFBR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислоты 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:TGFBR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR11, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислоты 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK2:TGFBR11 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или TGFBR11). В других предпочтительных вариантах осуществления гете-

ромультимерные комплексы ALK2:TGFBRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:TGFBRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и TGFBRII). Гетеромультимерные комплексы ALK2:TGFBRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:TGFBRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислоты 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислоты 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK3:TGFBRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или TGFBRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:TGFBRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:TGFBRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и TGFBRII). Гетеромультимерные комплексы ALK3:TGFBRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:TGFBRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислоты 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислоты 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK4:TGFBRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или TGFBRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:TGFBRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7,

BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:TGFBRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и TGFBRII). Гетеромультимерные комплексы ALK4:TGFBRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:TGFBRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислоты 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK5:TGFBRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или TGFBRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:TGFBRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:TGFBRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и TGFBRII). Гетеромультимерные комплексы ALK5:TGFBRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:TGFBRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислоты 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислоты 62-132 SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK6:TGFBRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK6 и/или TGFBRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:TGFBRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10,

GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:TGFBR11 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK6 и TGFBR11). Гетеромультимерные комплексы ALK6:TGFBR11 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:TGFBR11 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBR11, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:TGFBR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислоты 28-93 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:TGFBR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR11, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK7:TGFBR11 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK7 и/или TGFBR11). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:TGFBR11 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:TGFBR11 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK7 и TGFBR11). Гетеромультимерные комплексы ALK7:TGFBR11 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:TGFBR11 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISR11, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:MISR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:MISR11 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISR11, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK1:MISR11 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или MISR11). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:MISR11 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин

BE, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и MISRII). Гетеромультимеры ALK1:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислоты 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK2:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и MISRII). Гетеромультимеры ALK2:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK3:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и MISRII). Гетеромультимеры ALK3:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры

и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK4:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и MISRII). Гетеромультимеры ALK4:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK5:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и MISRII). Гетеромультимеры ALK5:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты,

функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK6:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK6 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK6 и MISRII). Гетеромультимеры ALK6:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-93 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK7:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK7 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK7 и MISRII). Гетеромультимеры ALK7:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид BMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:BMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей

мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:VMРRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид VMРRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:VMРRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или VMРRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:VMРRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:VMРRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и VMРRII). Гетеромультимерные комплексы ALK1:VMРRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK1:VMРRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид VMРRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:VMРRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:VMРRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид VMРRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:VMРRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или VMРRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:VMРRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:VMРRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и VMРRII). Гетеромультимерные комплексы ALK2:VMРRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK2:VMРRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид VMРRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:VMРRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:VMРRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид VMРRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90,

91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK3:VMPRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или VMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:VMPRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:VMPRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и VMPRII). Гетеромультимерные комплексы ALK3:VMPRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK3:VMPRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид VMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:VMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:VMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид VMPRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK4:VMPRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или VMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:VMPRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:VMPRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и VMPRII). Гетеромультимерные комплексы ALK4:VMPRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK4:VMPRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид VMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:VMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:VMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид VMPRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK5:VMPRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или VMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:VMPRII по изобретению

связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:BMPII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и BMPII). Гетеромультимерные комплексы ALK5:BMPII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK5:BMPII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид BMPII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:BMPII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:BMPII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK6:BMPII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK6 и/или BMPII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:BMPII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:BMPII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK6 и BMPII). Гетеромультимерные комплексы ALK6:BMPII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK6:BMPII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид BMPII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:BMPII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:BMPII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. Предпочтительно гетеромультимеры ALK7:BMPII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK7 и/или BMPII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:BMPII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9,

BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK7:VMPRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK7 и VMPRII). Гетеромультимерные комплексы ALK7:VMPRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы ALK7:VMPRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK2 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK2). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK2). Гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK2 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK2). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1

и ALK2). Гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK2 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK3 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK3 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK3 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK3). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK3 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK3 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK3). Гетеромультимеры ALK1:ALK3 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK3 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK4 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK4). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK4). Гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеро-

мультимеры ALK1:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK4 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK4). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK4). Гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK4 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK5 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK5). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK5 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK5 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK5). Гетеромультимеры ALK1:ALK5 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK5 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%

идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK6 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK6). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK6 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK6 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK6). Гетеромультимеры ALK1:ALK6 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK6 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK1, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15, 124, 126, 171, 172, 413, 414, 463 и 464 или аминокислотам 34-95 SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. Предпочтительно гетеромультимеры ALK1:ALK7 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK1 и/или ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK7 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK7 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK1 и ALK7). Гетеромультимеры ALK1:ALK7 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK1:ALK7 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK3 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK3 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:ALK3 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ALK3). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK3 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (на-

пример, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK3 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ALK3). Гетеромультимеры ALK2:ALK3 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK3 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:ALK4 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ALK4). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK4 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK4 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ALK4). Гетеромультимеры ALK2:ALK4 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK4 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:ALK5 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ALK5). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK5 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK5 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда

по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ALK5). Гетеромультимеры ALK2:ALK5 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK5 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:ALK6 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ALK6). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK6 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK6 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ALK6). Гетеромультимеры ALK2:ALK6 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK6 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465 и 466 или аминокислотам 35-99 SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. Предпочтительно гетеромультимеры ALK2:ALK7 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK2 и/или ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK7 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK7 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK2 и ALK7). Гетеромультимеры ALK2:ALK7 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK2:ALK7 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере

мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK4 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. Предпочтительно гетеромультимеры ALK3:ALK4 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или ALK4). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK4 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK4 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и ALK4). Гетеромультимеры ALK3:ALK4 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK4 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. Предпочтительно гетеромультимеры ALK3:ALK5 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или ALK5). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK5 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK5 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и ALK5). Гетеромультимеры ALK3:ALK5 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK5 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO:

22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. Предпочтительно гетеромультимеры ALK3:ALK6 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или ALK6). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK6 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK6 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и ALK6). Гетеромультимеры ALK3:ALK6 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK6 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK3, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467 и 468 или аминокислотам 61-130 SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. Предпочтительно гетеромультимеры ALK3:ALK7 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK3 и/или ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK7 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK7 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK3 и ALK7). Гетеромультимеры ALK3:ALK7 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK3:ALK7 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK5 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. Предпочтитель-

но гетеромультимеры ALK4:ALK5 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или ALK5). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK5 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK5 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и ALK5). Гетеромультимеры ALK4:ALK5 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK5 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. Предпочтительно гетеромультимеры ALK4:ALK6 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или ALK6). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK6 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK6 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и ALK6). Гетеромультимеры ALK4:ALK6 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK6 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469 и 470 или аминокислотам 34-101 SEQ ID NO: 26 или 83. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. Предпочтительно гетеромультимеры ALK4:ALK7 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK4 и/или ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK7 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3,

BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK7 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK4 и ALK7). Гетеромультимеры ALK4:ALK7 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ALK7 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK6 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. Предпочтительно гетеромультимеры ALK5:ALK6 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или ALK6). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK6 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK6 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и ALK6). Гетеромультимеры ALK5:ALK6 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK6 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK5, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471 и 472 или аминокислотам 36-106 SEQ ID NO: 30 или 87. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. Предпочтительно гетеромультимеры ALK5:ALK7 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK5 и/или ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK7 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK7 по изобретению обладают отличающейся спе-

цифичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK5 и ALK7). Гетеромультимеры ALK5:ALK7 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK5:ALK7 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ALK7, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK6, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473 и 474 или аминокислотам 32-102 SEQ ID NO: 34 или аминокислотам 62-132 SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ALK7 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ALK7, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475 и 476 или аминокислотам 28-92 SEQ ID NO: 38, 305 или 309. Предпочтительно гетеромультимеры ALK5:ALK7 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ALK6 и/или ALK7). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ALK7 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ALK7 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ALK6 и ALK7). Гетеромультимеры ALK6:ALK7 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK6:ALK7 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454 или аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1 или 25-131 SEQ ID NO: 1. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIA и/или ActRIIB). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIA и ActRIIB). Гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:ActRIIB по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид BMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 и 71. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIA и/или BMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIA и BMPRII). Гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:BMPRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIA и/или BMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIA и TGFBRII). Гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:TGFBRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеро-

мультимеры ActRIIA:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIA, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451 и 452 или аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75, и 79. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIA:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIA и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIA и MISRII). Гетеромультимеры ActRIIA:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIA:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид BMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454 или аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1 или 25-131 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 и 71. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIB и/или BMPRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIB и BMPRII). Гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:BMPRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:TGFBRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454 или аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1 или 25-131 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультиме-

ры ActRIIB:TGFBR2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIB:TGFBR2 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIB и/или TGFBR2). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:TGFBR2 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:TGFBR2 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIB и TGFBR2). Гетеромультимеры ActRIIB:TGFBR2 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:TGFBR2 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISR2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453 и 454 или аминокислотам 29-109 SEQ ID NO: 1 или 25-131 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISR2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75, и 79. Предпочтительно гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен ActRIIB и/или MISR2). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами ActRIIB и MISR2). Гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ActRIIB:MISR2 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и

462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. Предпочтительно гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен BMPRII и/или TGFBR2). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами BMPRII и TGFBR2). Гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:TGFBR2 по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид BMPRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455 и 456 или аминокислотам 34-123 SEQ ID NO: 46 или 71. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимеры BMPRII:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен BMPRII и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются антагонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами BMPRII и MISRII). Гетеромультимеры BMPRII:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры BMPRII:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых аспектах изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, и по меньшей мере один полипептид MISRII, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры TGFBR2:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид TGFBR2, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462 или аминокислотам 44-168 SEQ ID NO: 67 или аминокислотам 51-143 SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры TGFBR2:MISRII по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид MISRII, который содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457 и 458 или аминокислотам 24-116 SEQ ID NO: 50, 75 или 79. Предпочтительно гетеромультимеры TGFBR2:MISRII по настоящему изобретению являются растворимыми (например, содержат внеклеточный домен TGFBR2 и/или MISRII). В других предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры TGFBR2:MISRII по изобретению связывают и/или ингибируют (являются анта-

гонистами) активность (например, индукция передачи сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры TGFBRII:MISRII по изобретению обладают отличающейся специфичностью/профилем связывания лиганда по сравнению с их соответствующими гомомультимерными комплексами (т.е. гомомультимерами TGFBRII и MISRII). Гетеромультимеры TGFBRII:MISRII по изобретению включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры TGFBRII:MISRII по изобретению представляют собой гетеродимеры.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к получению функциональных вариантов посредством модификации структуры полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7) и/или полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII) для таких целей, как повышение терапевтической эффективности и стабильности (например, срок хранения и устойчивость к протеолитической деградации *in vivo*). Варианты можно получать посредством замены, делеции, вставки аминокислот или их комбинаций. Например, имеются основания ожидать, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или сходная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой (например, консервативные мутации) не будет иметь выраженного эффекта на биологическую активность полученной молекулы. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в пределах семейства аминокислот, являющихся родственными по их боковым цепям. То, приведет ли изменение аминокислотной последовательности полипептида по изобретению к а функциональному гомологу, можно без труда определить посредством оценки способности варианта полипептида вызывать ответ в клетках аналогично полипептиду дикого типа или связываться с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF-бета, например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином АЕ, активином ВС, активином ВЕ, nodal, глиальным нейротрофическим фактором (GDNF), нейротурином, артемином, персефином, MIS и Lefty.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к получению функциональных вариантов посредством модификации структуры полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и/или полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета для таких целей, как повышение терапевтической эффективности или стабильности (например, увеличенный срок хранения и/или повышенная устойчивость к протеолитической деградации).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конкретным мутациям полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6, и ALK7) и/или полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBRII, BMPRII и MISRII) по изобретению, так чтобы изменилось гликозилирование полипептида. Такие мутации могут быть выбраны, чтобы вносить или устранять один или несколько участков гликозилирования, таких как участки О-связанного или N-связанного гликозилирования. Участки распознавания для аспарагин-связанного гликозилирования, как правило, содержат трипептидную последовательность, аспарагин-Х-треонин или аспарагин-Х-серин (где "Х" представляет собой любую аминокислоту), которая специфически распознается соответствующими клеточными ферментами гликозилирования.

Изменение также можно проводить посредством вставки или замены одним или несколькими остатками серина или треонина в последовательности полипептида (для участков О-связанного гликозилирования). Различные аминокислотные замены или делеции в одном или обоих из первого или третьего положений аминокислот участка распознавания для гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) приводят к отсутствию гликозилирования модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом увеличения количества углеводных частей на полипептиде является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду. В зависимости от используемого способа присоединения, остаток(и) сахара может быть присоединен к (а) аргинину и гистидину; (б) свободным карбоксильным группам; (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как сульфгидрильные группы цистеина; (д) свободным гидроксильным группам, таким как гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина; (е) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан; или (ф) амидной группе глутамина. Удаление одной или нескольких углеводных частей, находящихся на полипептиде, можно проводить химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование может вовлекать, например, воздействие на полипептид трифторметансульфоновой кисло-

ты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к отщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), в то время как аминокислотная последовательность остается интактной. Ферментативное отщепление углеводных частей на полипептидах можно проводить с использованием различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al. [Meth. Enzymol. (1987) 138:350].

Последовательность полипептида можно изменять, соответствующим образом, в зависимости от типа используемой экспрессирующей системы, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут обеспечивать различный характер гликозилирования, на который может влиять аминокислотная последовательность пептида. Как правило, комплексы рецепторов типа I и II суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению для применения у человека можно экспрессировать в клеточной линии млекопитающего, которая обеспечивает надлежащее гликозилирование, такой как клеточные линии HEK293 или CHO, хотя ожидается, что также будут полезными другие клеточные линии млекопитающих.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения мутантов, в частности, наборов комбинаторных мутантов полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета (например, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6 и ALK7) и/или полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета (например, ActRIIA, ActRIIB, TGFBR2, BMPRII и MISRII) по настоящему изобретению, а также мутантов с укорочением. Совокупности комбинаторных мутантов являются особенно пригодными для идентификации функционально активных (например, связывающих лиганд) последовательностей рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета и/или рецепторов II белков суперсемейства TGF-бета. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть получение, например, вариантов полипептидов, которые имеют измененные свойства, такие как измененная фармакокинетика или измененное связывание лиганда. Различные скрининговые анализы представлены ниже, и такие способы анализа можно использовать для оценки вариантов. Например, варианты комплексов рецепторов типа I и II белков суперсемейства TGF-бета можно подвергать скринингу в отношении способности связываться с лигандом суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин A, активин B, активин C, активин E, активин AB, активин AC, активин AE, активин BC, активин BE, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty), для предотвращения связывания лиганда суперсемейства TGF-бета с рецептором белка суперсемейства TGF-бета и/или для предотвращения передачи сигнала, обеспечиваемой лигандом суперсемейства TGF-бета.

Активность гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению также можно исследовать, например, в клеточном анализе или анализе *in vivo*. Например, можно оценивать эффект гетеромультимерного комплекса на экспрессию генов или активность белков, вовлеченных в образование мышц в мышечных клетках. При необходимости его можно проводить в присутствии одного или нескольких рекомбинантных белков-лигандов суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин A, активин B, активин C, активин E, активин AB, активин AC, активин AE, активин BC, активин BE, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty), и клетки можно трансфицировать для продукции комплекса рецепторов типа I и II белков суперсемейства TGF-бета и необязательно лиганда суперсемейства TGF-бета. Аналогично гетеромультимерный комплекс по изобретению можно вводить мышам или другому животному и можно оценивать один или несколько показателей, таких как образование и сила мышц, с использованием известных в данной области способов. Аналогично, активность гетеромультимера или его вариантов можно исследовать в остеобластах, адипоцитах и/или нейрональных клеток в отношении какого-либо эффекта на рост этих клеток, например, способами анализа, как описано в настоящем описании, и способами анализа, общеизвестными в данной области. В таких клеточных линиях можно использовать отвечающий на SMAD рецепторный ген для мониторинга эффектов на последующую передачу сигнала.

Можно получать происходящие из комбинаторных библиотек варианты, которые имеют увеличенную селективность или повышенную в общем эффективность относительно эталонного гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета. Такие варианты, когда они экспрессируются с рекомбинантных конструкций ДНК, можно использовать в протоколах генной терапии. Аналогично, мутагенез может давать начало вариантам, которые имеют внутриклеточное время полужизни, значительно отличающееся от соответствующего немодифицированного гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета. Например, измененному белку можно сообщить либо более высокую устойчивость, либо меньшую устойчивость к протеолитической деградации или другим клеточным процессам, которые приводят к разрушению или в ином случае к инактивации немодифицированного полипептида. Такие варианты и гены, которые кодируют их, можно использовать для изменения уровней полипептидного комплекса посредством модулирования времени полужизни полипептида.

Например, короткое время полужизни может приводить к более кратковременным биологическим эффектам и, когда речь идет отчасти индуцибельной экспрессирующей системы, может позволить более строгий контроль уровней рекомбинантного полипептидного комплекса в клетке. В слитом с Fc белке мутации можно вносить в линкер (при его наличии) и/или в Fc-часть для изменения одного или нескольких видов активности гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, включая, например, иммуногенность, время полужизни и растворимость.

Комбинаторную библиотеку можно получать посредством вырождения библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых включает по меньшей мере часть потенциальных последовательностей рецепторов типа I и/или II белков суперсемейства TGF-бета. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативно лигировать в последовательности генов, так чтобы вырожденный набор нуклеотидных последовательностей, кодирующих потенциальные рецепторы типа I и/или II белков суперсемейства TGF-бета, мог экспрессироваться в качестве индивидуальных полипептидов или альтернативно в качестве более крупных слитых белков (например, для фагового дисплея).

Существует множество способов, посредством которых можно получать библиотеку потенциальных гомологов из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной последовательности гена можно проводить на автоматизированном устройстве для синтеза ДНК, а затем синтетические гены можно лигировать в подходящий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в данной области. См., например, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477. Такие способы используют в направленной эволюции других белков. См., например, Scott et al. (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al. (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; а также патенты США № 5223409, 5198346 и 5096815.

Альтернативно для получения комбинаторной библиотеки можно использовать другие формы мутагенеза. Например, гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно получать и выделять из библиотеки посредством скрининга с использованием, например, аланин-сканирующего мутагенеза [см., например, Ruf et al. (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al. (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al. (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; и Cunningham et al. (1989) *Science* 244:1081-1085], посредством линкер-сканирующего мутагенеза [см., например, Gustin et al. (1993) *Virology* 193:653-660; и Brown et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al. (1982) *Science* 232:316], посредством насыщающего мутагенеза [см., например, Meyers et al. (1986) *Science* 232:613]; посредством ПЦР-мутагенеза [см., например, Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19]; или посредством случайного мутагенеза, включая химический мутагенез [см., например, Miller et al. (1992) *A SHORT Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; и Greener et al. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34]. Линкер-сканирующий мутагенез, в частности, в случае комбинаторных библиотек, является привлекательным способом идентификации укороченных (биологически активных) форм полипептидов рецепторов типа I и/или II белков суперсемейства TGF-бета.

В данной области известен широкий диапазон способов скрининга продуктов генов комбинаторных библиотек, полученных посредством точковых мутаций и укорочений, и, в связи с этим, скрининга библиотек кДНК в отношении продуктов генов, имеющих определенное свойство. Такие способы, как правило, являются адаптируемыми для быстрого скрининга библиотек генов, полученных посредством комбинаторного мутагенеза гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению. Наиболее широко используемые способы скрининга крупных библиотек генов, как правило, включают клонирование библиотеки генов в реплицирующиеся экспрессирующие векторы, трансформацию соответствующих клеток полученной библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых обнаружение желаемой активности способствует относительно простому выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. Предпочтительные способы анализа включают анализы связывания лиганда суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty) и/или анализы опосредуемой лигандом суперсемейства TGF-бета клеточной передачи сигнала.

В определенных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы рецепторов типа I и II белков суперсемейства TGF-бета по изобретению могут дополнительно содержать посттрансляционные модификации в дополнение к любым модификациям, которые естественным образом присутствуют в полипептиде рецептора типа I и/или II белков суперсемейства TGF-бета. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование. В результате гетеромультимерный комплекс рецепторов типа I и II супер-

семейства TGF-бета может содержать неаминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, полисахарид или моносахарид, и фосфаты. Эффекты таких неаминокислотных элементов на функциональность гетеромультимерного комплекса можно исследовать, как описано в настоящем описании для других вариантов гетеромультимерных комплексов. Когда полипептид по изобретению продуцируется в клетках посредством расщепления образующейся формы полипептида, посттрансляционный процессинг также может быть важным для правильного сворачивания и/или функционирования белка. Различные клетки (например, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) обладают определенным клеточным аппаратом и характерными механизмами для такой посттрансляционной активности и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, а также гетеромультимеров, содержащих их.

В некоторых аспектах полипептиды, описанные в настоящем описании, могут образовывать белковые комплексы, содержащие по меньшей мере один полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета, связанный, ковалентно или нековалентно, по меньшей мере с одним полипептидом рецептора типа II. Предпочтительно полипептиды, описанные в настоящем описании, образуют гетеродимерные комплексы, хотя также включены гетеромультимерные комплексы (гетеромультимеры) более высокого порядка, такие как, но не ограничиваясь ими, гетеротримеры, гетеротетрамеры и другие олигомерные структуры (см., например, фиг. 1, 2 и 15-17). В некоторых вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа I и/или типа II суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один домен мультимеризации. Как описано в настоящем описании, термин "домен мультимеризации" относится к аминокислоте или последовательности аминокислот, которые обеспечивают ковалентное или нековалентное взаимодействие между по меньшей мере первым полипептидом и по меньшей мере вторым полипептидом. Полипептиды, описанные в настоящем описании, могут быть связаны ковалентно или нековалентно с доменом мультимеризации. Предпочтительно домен мультимеризации обеспечивает взаимодействие между первым полипептидом (например, полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета) и вторым полипептидом (например, полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета), способствуя образованию гетеромультимера (например, образованию гетеродимера), и необязательно препятствует или иным образом делает непредпочтительным образование гомомультимера (например, образование гомодимера), тем самым повышая выход желаемого гетеромультимера (см., например, фиг. 2).

Для получения комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать способы, известные в данной области. Например, не встречающиеся в природе дисульфидные связи можно конструировать посредством замены в первом полипептиде (например, полипептид рецептора типа I белка суперсемейства TGF-бета) встречающейся в природе аминокислоты содержащим свободный тиол остатком, так чтобы свободный тиол взаимодействовал с другим содержащим свободный тиол остатком на втором полипептиде (например, полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета), так что между первым и вторым полипептидами образуется дисульфидная связь. Дополнительные примеры взаимодействий для обеспечения образования гетеромультимера включают, но не ограничиваются ими, ионные взаимодействия, такие как взаимодействия, описанные в Kjaergaard et al., WO2007147901; эффекты электростатического направления, такие как эффекты, описанные в Kannan et al., U.S.8592562; биспиральные взаимодействия, такие как взаимодействия, описанные в Christensen et al., U.S.20120302737; лейциновые молнии, такие как описаны в Pack & Plueckthun, (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584; и мотивы спираль-поворот-спираль, такие как описаны в Pack et al. (1993) *Bio/Technology* 11: 1271-1277. Связывания различных сегментов можно достигать, например, посредством ковалентного связывания, например, посредством химического сшивания, пептидных линкеров, дисульфидных мостиков и т.д. или аффинных взаимодействий, таких как посредством технологии авидина-биотина или лейциновой молнии.

В некоторых аспектах домен мультимеризации может содержать один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, описанные в настоящем описании, могут образовывать белковые комплексы, содержащие первый полипептид, ковалентно или нековалентно связанный со вторым полипептидом, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность первого представителя взаимодействующей пары; и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета и аминокислотную последовательность второго представителя взаимодействующей пары.

Взаимодействующая пара может представлять собой любые две полипептидных последовательности, которые взаимодействуют с образованием комплекса, в частности, гетеродимерного комплекса, хотя в функциональных вариантах осуществления также может использоваться взаимодействующая пара, которая может образовывать гомодимерный комплекс. Один представитель взаимодействующей пары может быть слит с полипептидом рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета, как описано в настоящем описании, включая, например, полипептидную последовательность, содержащую, по существу состоящую или состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 14, 15,

124, 126, 171, 172, 413, 414, 463, 464, 18, 19, 136, 138, 173, 174, 421, 422, 465, 466, 22, 23, 115, 117, 175, 176, 407, 408, 467, 468, 26, 27, 83, 84, 104, 106, 177, 178, 403, 404, 469, 470, 30, 31, 87, 88, 139, 141, 179, 180, 423, 424, 471, 472, 34, 35, 91, 92, 142, 144, 181, 182, 425, 426, 473, 474, 38, 39, 301, 302, 305, 306, 309, 310, 313, 112, 114, 183, 184, 405, 406, 475, 476, 9, 10, 11, 118, 120, 151, 152, 409, 410, 451, 452, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 100, 102, 153, 154, 401, 402, 453, 454, 46, 47, 71, 72, 121, 123, 155, 156, 411, 412, 455, 456, 50, 51, 75, 76, 79, 80, 133, 135, 161, 162, 419, 420, 457, 458, 42, 43, 67, 68, 127, 129, 130, 132, 157, 158, 159, 160, 415, 416, 417, 418, 459, 460, 461 и 462. Взаимодействующая пара может быть выбрана так, чтобы сообщать улучшенное свойство/активность, такие как увеличенное время полужизни в сыворотке, или чтобы действовать в качестве адаптера, с которым связана другая часть для обеспечения улучшенного свойства/активности. Например, часть полиэтиленгликоля может быть связана с одним или обоими компонентами взаимодействующей пары для обеспечения улучшенного свойства/активности, таких как увеличенное время полужизни.

Первый и второй представители взаимодействующей пары могут представлять собой асимметричную пару, что означает, что представители пары предпочтительно ассоциируют друг с другом, а не сами с собой. Таким образом, первый и второй представители асимметричной взаимодействующей пары могут ассоциировать с образованием гетеродимерного комплекса (см., например, фиг. 2). Альтернативно взаимодействующая пара может быть ненаправленной, что означает, что представители пары могут ассоциировать друг с другом или связываться с собой без существенного предпочтения и, таким образом, могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. Таким образом, первый и второй представители ненаправленной взаимодействующей пары могут ассоциировать с образованием гомодимерного комплекса или гетеродимерного комплекса. Необязательно, первый представитель взаимодействующей пары (например, асимметричная пара или ненаправленная взаимодействующая пара) ассоциирует с вторым представителем взаимодействующей пары. Необязательно, первый представитель взаимодействующей пары (например, асимметричная пара или ненаправленная взаимодействующая пара) ассоциирует с вторым представителем взаимодействующей пары.

В качестве конкретных примеров, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим полипептиды рецепторов типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета, слитые с полипептидом, содержащим константный домен иммуноглобулина, такой как домен CH1, CH2 или CH3 иммуноглобулина или Fc-домен. В рамках настоящего изобретения предусматриваются Fc-домены, происходящие из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Известны другие мутации, которые снижают либо активность CDC, либо активность ADCC, и в совокупности любые из этих вариантов включены в изобретение и могут быть использованы в качестве преимущественных компонентов гетеромультимерного комплекса по изобретению. Необязательно, Fc-домен IgG1 SEQ ID NO: 208 имеет одну или несколько мутаций в остатках, таких как Asp-265, Lys-322 и Asn-434 (пронумерованы в соответствии с соответствующим полноразмерным IgG1). В определенных случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asp-265) обладает сниженной способностью связываться с Fcγ-рецептором относительно Fc-домена дикого типа. В других случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asn-434) имеет увеличенную способность связываться с родственным МНС класса I Fc-рецептором (FcRN) относительно Fc-домена дикого типа. Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc-части IgG1 человека (G1Fc), показан ниже (SEQ ID NO: 208). Подчеркиванием пунктирной линией указана шарнирная область и подчеркиванием сплошной линией указаны положения с встречающимися в природе вариантами. Частично изобретение относится к полипептидам, содержащим, состоящим из или по существу состоящим из аминокислотной последовательности, обладающей 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью SEQ ID NO: 208. Встречающиеся в природе варианты G1Fc включают E134D и M136L в соответствии с системой нумерации, используемой в SEQ ID NO: 208 (см. Uniprot P01857).

```

1  THTCPPCAP ELLGGPSVFL FPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQFENNYK TTPPVLDSG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 208)

```

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc-части IgG2 человека (G2Fc) показан ниже (SEQ ID NO: 209). Подчеркиванием пунктирной линией указана шарнирная область и подчеркиванием двойной линией указаны положения, в которых существуют противоречия последовательностей в базе данных (согласно UniProt P01859). Частично, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим, состоящим из или по существу состоящим из аминокислотной последовательности, обладающей 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью SEQ ID NO: 209.

```

1 VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDEPEVQ
51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK (SEQ ID NO: 209)

```

Два примера аминокислотных последовательностей, которые можно использовать для Fc-части IgG3 человека (G3Fc), показаны ниже. Шарнирная область в G3Fc может быть вплоть до четырех раз длиннее, чем в других цепях Fc и содержит три идентичных сегмента из 15 остатков, которым предшествует сходный сегмент из 17 остатков. Первая последовательность G3Fc, показанная ниже (SEQ ID NO: 210), содержит короткую шарнирную область, состоящую из одного сегмента из 15 остатков, в то время как вторая последовательность G3Fc (SEQ ID NO: 211) содержит полноразмерную шарнирную область. В каждом случае пунктирной линией указана шарнирная область и сплошной линией указаны положения с встречающимися в природе вариантами согласно UniProt P01859. Частично, изобретение относится к полипептидам, содержащим, состоящим из или по существу состоящим из аминокислотной последовательности с 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 210 и 211.

```

1 EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP PKPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51 VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 210)
1 ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51 SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLT V LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRETQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 211)

```

Встречающиеся в природе варианты G3Fc (например, см. UniProt P01860) включают E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y, если их адаптировать к системе нумерации, используемой в SEQ ID NO: 210, и настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим домены G3Fc, содержащие один или несколько из этих вариантов. Кроме того, ген иммуноглобулина IgG3 человека (IGHG3) демонстрирует структурный полиморфизм, характеризующийся различной длиной шарнирной области [см. UniProt P01859]. В частности, вариант WIS лишен основной части V-области и всей области CH1. Он имеет дополнительную межцепочечную дисульфидную связь в положении 7 в дополнение к 11 обычно присутствующим в шарнирной области. Вариант ZUC лишен основной части V-области, всей области CH1 и части шарнирной области. Вариант OMM может соответствовать аллельной форме или другому подклассу гамма-цепи. Настоящее изобретение относится к дополнительным слитым белкам, содержащим домены G3Fc, содержащие один или несколько из этих вариантов.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc-части IgG4 (G4Fc) человека, показан ниже (SEQ ID NO: 212). Подчеркиванием пунктирной линией указана шарнирная область. Частично, изобретение относится к полипептидам, содержащим, состоящим из или по существу состоящим из аминокислотной последовательности, обладающей 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 212.

```

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLT V LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 212)

```

В настоящем описании представлены различные встроенные способами инженерии мутации в Fc-домене относительно последовательности G1Fc (SEQ ID NO: 208) и аналогичные мутации в G2Fc, G3Fc и G4Fc могут быть выявлены из их выравнивания с G1Fc, представленного на фиг. 5. Вследствие неравной длины шарнирных областей, аналогичные положения Fc на основе выравнивания изотипов (фиг. 5) обладают различными номерами аминокислот в SEQ ID NO: 208, 209, 210 и 212. Также может быть понятно, что данное положение аминокислоты в последовательности иммуноглобулина, состоящей из шарнирной области, областей C_{H2} и C_{H3} (например, SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211 или 212) идентифицировано отличающимся номером относительно того же положения, когда нумерация охватывает весь константный домен тяжелой цепи IgG1 (состоящий из области C_{H1}, шарнирной области, областей C_{H2}, и C_{H3}), как и в базе данных Uniprot. Например, соответствие между выбранными положениями C_{H3} в по-

следовательности G1Fc человека (SEQ ID NO: 208), константного домена тяжелой цепи IgG1 человека (Uniprot P01857) и тяжелой цепью IgG1 человека является следующим.

Соответствие положений C _H 3 в различных системах нумерации		
G1Fc (Нумерация начинается с первого остатка треонина шарнирной области)	Константный домен тяжелой цепи IgG1 (Нумерация начинается с C _H 1)	Тяжелая цепь IgG1 (Схема нумерации EU согласно Kabat et al., 1991*)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
* Kabat et al. (eds) 1991; pp. 688-696, <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5 th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.		

Проблема, которая возникает при крупномасштабной продукции асимметричных белков на основе иммуноглобулинов из одной клеточной линии известна как "проблема ассоциации цепей". Заметно препятствуя получению биспецифических антител, проблема ассоциации цепей касается задачи эффективного продуцирования желаемого белка из множества цепей из множества комбинаций, которые имманентно появляются, когда различные тяжелые цепи и/или легкие цепи продуцируют в одной клеточной линии [см., например, Klein et al. (2012) *mAbs* 4:653-663]. Эта проблема является наиболее выраженной, когда две тяжелых цепи и две легких цепи продуцируются в одной клеточной линии, и в этом случае возможно всего 16 комбинаций цепей (хотя некоторые из них являются идентичными), когда желаемой обычно является только одна. Тем не менее, тот же принцип объясняет сниженный выход желаемого слитого белка из множества цепей, который включает только две различных (асимметричных) тяжелых цепи.

В данной области известны различные способы, которые повышают желаемое образование пар Fc-содержащих слитых полипептидных цепей в одной клеточной линии для получения предпочтительного асимметричного слитого белка с приемлемым выходом [см., например, Klein et al. (2012) *mAbs* 4:653-663; и Spiess et al. (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Способы обеспечения образования желаемых пар Fc-содержащих цепей включают, но не ограничиваются ими, образование пар на основе зарядов (электростатическое направление), пространственное образование пар "выступы в полостях", образование пар SEEDbody и образование пар на основе лейциновой молнии. См., например, Ridgway et al. (1996) *Protein Eng* 9:617-621; Merchant et al. (1998) *Nat Biotech* 16:677-681; Davis et al. (2010) *Protein Eng Des Sel* 23:195-202; Gunasekaran et al. (2010); 285:19637-19646; Wranik et al. (2012) *J. Biol. Chem* 287:43331-43339; US5932448; WO 1993/011162; WO 2009/089004 и WO 2011/034605. Как описано в настоящем описании, эти способы можно использовать для получения гетеродимеров, содержащих полипептиды рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF-бета: по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, и по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета. См. фиг. 15-17.

Например, одним из способов, посредством которых может быть обеспечено взаимодействие между определенными полипептидами, является конструирование комплементарных областей "выступ в полости" (выпуклость в углублении), как описано в Arathoon et al., U.S.7183076 и Carter et al., U.S.5731168. "Выступы" конструируют путем замены небольших боковых цепей аминокислот с контактной поверхности первого полипептида (например, первая взаимодействующая пара) более крупными боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). Комплементарные "полости" идентичного или сходного размера с выступами необязательно создают на контактной поверхности второго полипептида (например, вторая взаимодействующая пара) посредством замены крупных боковых цепей аминокислот меньшими (например, аланин или треонин). Когда подходящим образом расположенный или имеющий подходящий размер выступ или полость находится на контактной поверхности либо первого, либо второго полипептида, необходимо только сконструировать соответствующую полость или выступ, соответственно, на соседней контактной поверхности.

При нейтральных значениях pH (7,0), аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота являются отрицательно заряженными и лизин, аргинин и гистидин являются положительно заряженными. Эти заря-

женные остатки можно использовать для способствования образованию гетеродимера и в то же время препятствования образованию гомодимера. Между противоположными зарядами происходят притягивающие взаимодействия, а между одинаковыми зарядами происходят отталкивающие взаимодействия. Частично, в белковых комплексах, описанных в настоящем описании, используются притягивающие взаимодействия для способствования образованию гетеромультимера (например, образованию гетеродимера) и необязательно отталкивающие взаимодействия для препятствования образованию гомодимера (например, образованию гомодимера) посредством проведения сайт-направленного мутагенеза заряженных остатков контактной поверхности.

Например, контактная поверхность СН3-домена IgG1 содержит четыре уникальных пары заряженных остатков, вовлеченных во взаимодействия домен-домен: Asp356-Lys439', Glu357-Lys370', Lys392-Asp399' и Asp399-Lys409' [нумерация остатков во второй цепи указана (')]. Следует отметить, что схема нумерации, используемая в настоящей заявке для обозначения остатков в домене СН3 IgG1, соответствует схеме нумерации EU по Kabat. Вследствие симметрии 2-го порядка, присутствующей во взаимодействиях доменов СН3-СН3, каждое уникальное взаимодействие будет представлено дважды в структуре (например, Asp-399-Lys409' и Lys409-Asp399'). В последовательности дикого типа K409-D399' способствует образованию как гетеродимера, так и гомодимера. Единичная мутация, переключающая полярность заряда (например, K409E; положительный на отрицательный заряд) в первой цепи приводит к неблагоприятным взаимодействиям для образования гомодимера первой цепи, неблагоприятные взаимодействия являются результатом отталкивающих взаимодействий между одинаковыми зарядами (отрицательный-отрицательный; K409E-D399' и D399-K409E'). Сходное переключение посредством мутации полярности заряда (D399K'; отрицательный на положительный) во второй цепи приводит к неблагоприятным взаимодействиям (K409'-D399K' и D399K-K409') для образования гомодимера второй цепи. Однако в то же время эти две мутации (K409E и D399K') приводят к благоприятным взаимодействиям (K409E-D399K' и D399-K409') для образования гетеродимера.

Эффект электростатического направления на образование гетеродимера и противодействия гомодимеру может быть далее усилен посредством мутации дополнительных заряженных остатков, которые могут образовывать пару или могут не образовывать пару с противоположно заряженным остатком во второй цепи, включая, например, Arg355 и Lys360. В таблице ниже приведены возможные мутации с изменением заряда, которые можно использовать, отдельно или в комбинации, для повышения образования гетеромультимеров полипептидных комплексов, описанных в настоящем описании.

Примеры парных мутация заряженных остатков для повышения образования гетеродимера			
Положение в первой цепи	Мутация в первой цепи	Взаимодействующее положение во второй цепи	Соответствующая мутация во второй цепи
Lys409	Asp или Glu	Asp399'	Lys, Arg или His
Lys392	Asp или Glu	Asp399'	Lys, Arg или His
Lys439	Asp или Glu	Asp356'	Lys, Arg или His
Lys370	Asp или Glu	Glu357'	Lys, Arg или His
Asp399	Lys, Arg или His	Lys409'	Asp или Glu
Asp399	Lys, Arg или His	Lys392'	Asp или Glu
Asp356	Lys, Arg или His	Lys439'	Asp или Glu
Glu357	Lys, Arg или His	Lys370'	Asp или Glu

В некоторых вариантах осуществления один или несколько остатков, которые формируют поверхность контакта СН3-СН3 в слитом белке настоящей заявки, заменены заряженной аминокислотой, так что взаимодействие становится электростатически неблагоприятным. Например, положительно заряженную аминокислоту на поверхности контакта (например, лизин, аргинин или гистидин) заменяют отрицательно заряженной аминокислотой (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота). Альтернативно или в комбинации с вышеуказанной заменой отрицательно заряженную аминокислоту на поверхности контакта заменяют положительно заряженной аминокислотой. В определенных вариантах осуществления аминокислоту заменяют не встречающейся в природе аминокислотой, имеющей желаемую зарядовую характеристику. Следует отметить, что мутация отрицательно заряженных остатков (Asp или Glu) на His приведет к увеличению объема боковой цепи, что может вызвать пространственные про-

блемы. Более того, форма донора и акцептора протонов His зависит от локальной среды. Эти вопросы следует учитывать в стратегии конструирования. Поскольку остатки контактной поверхности являются высококонсервативными в подклассах IgG человека и мыши, эффекты электростатического направления, описанные в настоящем описании, могут применяться к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека и мыши. Эту стратегию также можно расширить на модификацию незаряженных остатков на заряженные остатки на контактной поверхности домена CH3.

Частично, изобретение относится к желаемому образованию пар асимметричных содержащих Fc полипептидных цепей с использованием последовательностей Fc, сконструированных так, чтобы они были комплементарными, исходя из образования зарядовых пар (электростатическое направление). Одну из пары последовательностей Fc с электростатической комплементарностью можно произвольным образом подвергать слиянию с полипептидом рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции, с необязательным линкером или без него, с получением слитого полипептида рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета. Эту единичную цепь можно совместно экспрессировать в выбранной клетке вместе с последовательностью Fc, комплементарной первому Fc, чтобы способствовать образованию желаемой конструкции с множеством цепей (например, гетеромерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета). В этом примере на основе электростатического направления SEQ ID NO: 200 [G1Fc(E134K/D177K) человека] и SEQ ID NO: 201 [G1Fc(K170D/K187D) человека] являются примерами комплементарных последовательностей Fc, в которых внесенные аминокислотные замены подчеркнуты двойной линией и полипептид рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции может быть слит либо с SEQ ID NO: 200, либо с SEQ ID NO: 201, но не с обоими из них. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, может быть понятно, что аминокислотные замены в соответствующих положениях hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) приведут к комплементарным парам Fc, которые можно использовать вместо комплементарной пары hG1Fc ниже (SEQ ID NO: 200 и 201).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRKEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLKSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 200)

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPPVLDSG SFFLYSDLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 201)

```

Частично, изобретение относится к желаемому образованию пар асимметричных Fc-содержащих полипептидных цепей с использованием последовательностей Fc, сконструированных для пространственной комплементарности. Частично изобретение относится к образованию пар "выступов в полости" в качестве примера пространственной комплементарности. Одну из пары последовательностей Fc с пространственной комплементарностью можно произвольным образом подвергать слиянию с полипептидом рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета, с необязательным линкером или без него, с получением слитого полипептида рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета. Эту единую цепь можно совместно экспрессировать в выбранной клетке вместе с последовательностью Fc, комплементарной первому Fc, чтобы способствовать образованию желаемой конструкции из множества цепей. В этом примере на основе образования пар по принципу "выступ в полости" SEQ ID NO: 202 [G1Fc(T144Y) человека] и SEQ ID NO: 203 [G1Fc(Y185T) человека] являются примерами комплементарных последовательностей Fc, в которых внесенные аминокислотные замены подчеркнуты двойной линией, и полипептид рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции может быть слит либо с SEQ ID NO: 202, либо с SEQ ID NO: 203, но не с обоими из них. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, может быть понятно, что аминокислотные замены в соответствующих положениях hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) обеспечат комплементарные пары Fc, которые можно использовать вместо комплементарной пары hG1Fc (SEQ ID NO: 202 и 203).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLYCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

```

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 202)
 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFL TSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 203)

Пример комплементарности Fc на основе образования пар по принципу "выступ в полости" в комбинации со сконструированной дисульфидной связью показан в SEQ ID NO: 204 [hG1Fc(S132C/T144W)] и SEQ ID NO: 205 [hG1Fc(Y127C/T144S/L146A/Y185V)]. Встроенные аминокислотные замены в этих последовательностях подчеркнуты двойной линией и полипептид рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции может быть слит либо с SEQ ID NO: 204, либо с SEQ ID NO: 205, но не с обоими из них. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, может быть понятно, что аминокислотные замены в соответствующих положениях hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) обеспечат комплементарные пары Fc, которые можно использовать вместо комплементарной пары hG1Fc (SEQ ID NO: 204 и 205).

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P CREEMTKNQ VSLCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 204)
 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 205)

Частично, изобретение относится к желаемому образованию пар между асимметричными Fc-содержащими полипептидными цепями с использованием последовательностей Fc, сконструированных для образования чередующихся сегментов β -цепи доменов C_{H3} IgG и IgA человека. Такие способы включают использование гетеродимеров C_{H3} со сконструированным доменом с обменом участками (SEED), что позволяет образование слитых белков SEEDbody [см., например, Davis et al. (2010) Protein Eng Design Sel 23:195-202]. Одну из пары последовательностей Fc с комплементарностью SEEDbody можно произвольно подвергать слиянию с полипептидом рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета, с необязательным линкером или без него, с получением слитого полипептида рецептора типа I или типа II суперсемейства TGF-бета. Эту единую цепь можно совместно экспрессировать в выбранной клетке с последовательностью Fc, комплементарной первому Fc, чтобы способствовать образованию желаемой конструкции из множества цепей. В этом примере на основе образования пар SEEDbody (Sb), SEQ ID NO: 206 [hG1Fc (Sb_{AG})] и SEQ ID NO: 207 [hG1Fc (Sb_{GA})] являются примерами комплементарных последовательностей Fc IgG, в которых встроенные аминокислотные замены из Fc IgA подчеркнуты двойной линией, и полипептид рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции может быть слит либо с SEQ ID NO: 206, либо с SEQ ID NO: 207, но не с обоими из них. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, может быть понятно, что аминокислотные замены в соответствующих положениях hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) обеспечат мономер Fc, который можно использовать в комплементарной паре IgG-IgA ниже (SEQ ID NO: 206 и 207).

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PERPEVHLLP PSREEMTKNQ VSLTCLARGF
 151 YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTPSROEPSQ GTTTFAVTSK LTVDKSRWQQ
 201 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK (SEQ ID NO: 206)
 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P PSEELALNE LVTLTCLVKG
 151 FYPSDIAVEW ESNGOELPRE KYLTWAPVLD SDGSFFLYSI LRVAEDPWKK
 201 GDTFSCSVMH EALHNHYTQK SLDRSPGK (SEQ ID NO: 207)

Частично, изобретение относится к желаемому образованию пар асимметричных Fc-содержащих полипептидных цепей с отщепляемым доменом лейциновой молнии, связанным с С-концом доменов C_{H3} Fc. Связывание лейциновой молнии является достаточным для обеспечения предпочтительной сборки

гетеродимерных тяжелых цепей антител. См., например, Wranik et al (2012) J. Biol. Chem 287:43331-43339. Как описано в настоящем описании, одна из пары последовательностей Fc, связанных с образующим лейциновую молнию участком, может быть произвольным образом слита с полипептидом рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции, с необязательным линкером или без него, с образованием слитого полипептида рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета. Эту единую цепь можно совместно экспрессировать в выбранной клетке с последовательностью Fc, связанной с комплементарным участком, образующим лейциновую молнию, чтобы способствовать образованию желаемой конструкции из множества цепей. Протеолитическое расщепление конструкции бактериальной эндопротеазой Lys-C после очистки может высвободить домен лейциновой молнии с образованием конструкции Fc, структура которой идентична структуре нативного Fc. В этом примере на основе образования пар посредством лейциновой молнии SEQ ID NO: 213 [hG1Fc-Ap1 (кислотный)] и SEQ ID NO: 214 [hG1Fc-Bp1 (основной)] являются примерами комплементарных последовательностей Fc IgG, в которых сконструированные комплементарные последовательности лейциновых молний подчеркнуты, и полипептид рецептора типа I или типа II белков суперсемейства TGF-бета конструкции может быть слит либо с SEQ ID NO: 213, либо с SEQ ID NO: 214, но не с обоими из них. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, может быть понятно, что образующие лейциновые молнии последовательности, связанные, с необязательным линкером или без него, с hG1Fc, hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) приведут к мономеру Fc, который можно использовать в комплементарной образующей лейциновую молнию паре, показанной ниже (SEQ ID NO: 213 и 214).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGK
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGKGGSAQ LEKELQALEK ENAQLEWELQ
251 ALEKELAOGA T (SEQ ID NO: 213)

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGK
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGKGGSAQ LKKKLQALKK KNAQLKWKLO
251 ALKKKLAOGA T (SEQ ID NO: 214)

```

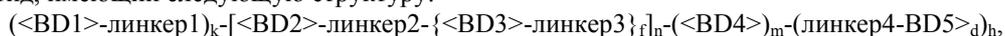
Как описано выше, в данной области известны различные способы, которые повышают желаемое образование пар Fc-содержащих слитых полипептидных цепей в одной клеточной линии для продуцирования предпочтительного асимметричного слитого белка с приемлемым выходом [Klein et al. (2012) mAbs 4:653-663; и Spiess et al. (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]. Кроме того, гетеромультимеры как описано в настоящем описании можно получать с использованием комбинации слитых белков тяжелой и легкой цепей, содержащих либо полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета, либо полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета может быть слитым, с линкерным доменом или без него, с тяжелой цепью иммуноглобулина (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1 или IgA2), которая содержит по меньшей мере часть домена C_H1. Аналогично, полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета может быть слитым, с линкерным доменом или без него, с легкой цепью иммуноглобулина (каппа или лямбда), которая содержит по меньшей мере часть константного домена легкой цепи (C_L). В альтернативных вариантах осуществления полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета может быть слит, с линкерным доменом или без него, с тяжелой цепью иммуноглобулина (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1 или IgA2), которая содержит по меньшей мере часть домена C_H1, и полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета может быть слит, с линкерным доменом или без него, с легкой цепью иммуноглобулина (каппа или лямбда), которая содержит по меньшей мере часть константного домена легкой цепи (C_L). В этой конструкции используется преимущество природной способности тяжелых цепей к гетеродимеризации с легкими цепями. В частности, гетеродимеризация тяжелой и легкой цепей происходит между C_H1 и C_L, и обычно стабилизируется ковалентным связыванием двух доменов дисульфидным мостиком. Конструкции, в которых используется полноразмерная тяжелая цепь или по меньшей мере часть тяжелой цепи, содержащая шарнирную область, может дать начало антитело-подобным молекулам, содержащим две "легких цепи" и две "тяжелых цепи". См. фиг. 16. Потенциальным преимуществом этой конструкции является то, что она может в большей степени имитировать встречающийся в природе комплекс полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета-лиганд-полипептид рецептора типа II суперсемейства TGF-бета, и может продемонстрировать более высокую аффинность в отношении лиганда, чем сравнимые единичные гетеродимеры. В некоторых вариантах осуществления эта конструкция может быть модифицирована путем

включения различных укорочений тяжелой цепи, включая, например, укорочения, которые содержат домен C_{H1} и часть или весь шарнирный домен (с получением $F(ab')_2$ -подобных молекул), а также укорочений, которые содержат только домен C_{H1} или его фрагмент (с получением Fab-подобных молекул). См. фиг. 166. Различные способы конструирования таких гетеромультимерных конструкций описаны в US 2009/0010879, Klein et al. [(2012) mAbs 4:653-663], и Spiess et al. [(2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106], содержание которых включено в настоящее описание в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления является желательным получение подобных антителам гетеродимеров, содержащих по меньшей мере одну ветвь комплекса, содержащего гетеродимерную пару полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета- C_L :полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета- C_{H1} , и по меньшей мере вторую ветвь, содержащую гетеродимерную пару полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета- C_L :полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета- C_{H1} . См., например, фиг. 16B. Такие гетеродимерные комплексы можно получать, например, с использованием комбинаций технологий асимметричного образования пар тяжелой цепи и легкой цепи [Spiess et al. (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]. Например, в технологии CrossMab [Schaefer et al. (2011). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108: 11187-11192] неправильное образование пар легких цепей преодолевают с использованием кроссинговера доменов и тяжелых цепей, гетеродимезированных с использованием выступов в полостях [Merchant et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16: 677-681]. Для кроссинговера доменов либо переменные домены, либо константные домены обмениваются между легкой и тяжелой цепями с получением двух асимметричных плеч Fab, которые обеспечивают образование пар родственных легких цепей при сохранении структурной и функциональной целостности переменного домена [Fenn et al. (2013) PLoS ONE 8: e61953]. Альтернативным подходом для преодоления неправильного образования пар легких цепей является конструирование тяжелых и легких цепей с перпендикулярными поверхностями контакта Fab [Lewis (2014) Nat. Biotechnol. 32: 191-198]. Это можно осуществлять посредством компьютерного моделирования [Das et al (2008) Annu. Rev. Biochem. 77: 363-382] в комбинации с рентгеновской кристаллографией для идентификации мутаций на поверхностях контакта V_H/V_L и C_{H1}/C_L . Для гетеродимеров, полученных с использованием этой методологии, может быть необходимым встраивание мутаций как в поверхность контакта V_H/V_L , так и в поверхность контакта C_{H1}/C_L для минимизации неправильного образования пар тяжелая/легкая цепь. Сконструированную перпендикулярную поверхность контакта Fab можно использовать совместно со стратегией гетеродимезации тяжелых цепей для способствования эффективной продукции IgG в одной клетке-хозяине. Также для получения перпендикулярных поверхностей контакта Fab можно использовать электростатическое направление, чтобы упростить конструирование таких гетеродимеров. Могут использоваться пептидные линкеры для обеспечения родственного образования пар легких и тяжелых цепей в формате, известном как "LUZ-Y" [Wranik et al. (2012) J. Biol. Chem. 287: 43331-43339], где гетеродимезацию тяжелых цепей проводят с использованием лейциновых молний, которые впоследствии можно удалять посредством протеолиза *in vitro*.

Альтернативно гетеромультимеры могут содержать одну или несколько одноцепочечных ловушек лигандов, как описано в настоящем описании, необязательно которые могут быть ковалентно или нековалентно связаны с одним или несколькими полипептидами рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета или полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета, а также дополнительными одноцепочечными ловушками лигандов полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета [US 2011/0236309 и US2009/0010879]. См. фиг. 12. Как описано в настоящем описании, одноцепочечные ловушки лигандов не требуют слияния с каким-либо доменом мультимеризации, таким как биспиральные Fc-домены, чтобы быть поливалентными. Как правило, одноцепочечные ловушки лигандов по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и один домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета. Полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и домены полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета, обычно обозначаемые в настоящем описании как связывающие домены (BD), необязательно могут быть связаны линкерной областью.

Например, в одном аспекте настоящее изобретение относится к гетеромультимерам, содержащим полипептид, имеющий следующую структуру:



где n и h независимо превышают или равны единице; d , f , m и k независимо равны или превышают ноль; $BD1$, $BD2$, $BD3$, $BD4$ и $BD5$ независимо представляют собой домены полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета или полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета, где по меньшей мере один из $BD1$, $BD2$, $BD3$ и $BD4$ представляет собой домен полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и где по меньшей мере один из $BD1$, $BD2$, $BD3$ и $BD4$ представляет собой домен полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета, и линкер1, линкер2, линкер3 и линкер 4 превышают или равны нулю. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные ловушки полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета содержат по меньшей мере два различных полипептида рецептора

типа I белков суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные ловушки полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II суперсемейства TGF-бета содержат по меньшей мере два различных полипептида рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные ловушки полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета содержат по меньшей мере два различных линкера. В зависимости от величин, выбранных для d, f, h, k, m и n, гетеромультимерная структура может содержать большое количество повторяющихся элементов в различных комбинациях или может иметь относительно простую структуру.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к гетеромультимерам, содержащим полипептид, имеющий следующую структуру:



В другом аспекте настоящее изобретение относится к гетеромультимерам, содержащим полипептид, имеющий следующую структуру:



где n превышает или равен одному.

Другой аспект изобретения относится к гетеромультимерам, содержащим полипептид, имеющий следующую структуру:



где f и g превышают или равны одному.

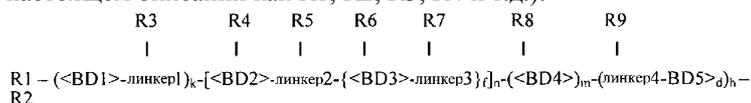
В одном варианте осуществления, где BD2 и BD3 являются одинаковыми, и f и g представляют собой одно и то же число, это может привести по существу к зеркальной симметричной структуре около линкера 2, при условии различий в линкерах. В случаях, когда BD2 отличается от BD3, и/или когда f и g представляют собой различные числа, продуцируются различные структуры. Специалист в данной области способен выбрать подходящие связывающие домены, линкеры и частоты повторов ввиду изобретения, описанного в настоящем описании, и информации в данной области. Конкретные неограничивающие примеры таких одноцепочечных ловушек лигандов в соответствии с настоящим изобретением схематично представлены на фиг. 18.

Линкеры (1, 2, 3 и 4) могут быть одинаковыми или могут различаться. Линкерная область представляет сегмент, который отличается от структурированных лиганд-связывающих доменов полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета и, таким образом, их можно использовать для конъюгации вспомогательных молекул (например, молекул, пригодных для повышения стабильности, таких как части для пегилирования) без необходимости химической модификации связывающих доменов. Линкер может включать неструктурированную аминокислотную последовательность, которая либо может быть такой же, либо может происходить из консервативных модификаций последовательности природной неструктурированной области во внеклеточной части рецептора для представляющего интерес лиганда или другого рецептора суперсемейства TGF-β. В других случаях такие линкеры могут быть полностью искусственными по составу и происхождению, но содержат аминокислоты, выбранные для обеспечения неструктурированного гибкого линкера с низкой вероятностью осложнений в виде электростатического или пространственного препятствия, когда они тесно сближаются с представляющим интерес лигандом. Длина линкера считается приемлемой, когда она позволяет связывающим доменам, расположенным на каждом из N- и C-концов линкера, связывать их природные участки связывания на их природном лиганде, так что, когда оба связывающих связаны таким образом, лиганд связывается с более высокой аффинностью, чем он связывался бы посредством связывания только с одним из связывающих доменов. В некоторых случаях количество аминокислотных остатков в линкер либо природного, либо искусственного происхождения выбирают так, чтобы оно было равным или превышало минимальное требуемое расстояние для одновременного (мостикового) связывания двух участков связывания на лиганде полипептида рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета и/или полипептида рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, и не ограничиваясь этим никоим образом, длина линкера может составлять приблизительно 1-10 аминокислот, 10-20 аминокислот, 18-80 аминокислот, 25-60 аминокислот, 35-45 аминокислот или любую другую подходящую длину.

Линкеры можно конструировать так, чтобы облегчать очистку полипептида. Точная выбранная схема очистки будет определять, какие модификации требуются, например, но не ограничиваясь этим, предусматриваются вставки "меток" для очистки, таких как His-метки; в других примерах линкер может включать области для облегчения присоединения молекул груза или вспомогательных молекул. Когда такое присоединение влияет на неструктурированную природу линкера или вносят потенциальную угрозу электростатического или пространственного препятствия, можно проводить соответствующее увеличение длины линкера, чтобы убедиться, что два связывающих домена способны связывать их соответствующие участки на лиганде. Ввиду способов и идей, описанных в настоящем описании, такое определение может проводиться стандартным образом специалист в данной области.

Кроме того, конструкция по настоящему изобретению позволяет присоединение двух молекул грузов (например, визуализирующие средства, такие как флуоресцентные молекулы), токсины и т.д. Напри-

мер, но не ограничиваясь этим никоим образом, одноцепочечные полипептиды можно модифицировать так, чтобы добавить одну или несколько молекул грузов и/или вспомогательных молекул (в совокупности обозначаемых в настоящем описании как R1, R2, R3, R4 и т.д.):



Не ограничиваясь универсальностью доступных заместителей R, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 могут присутствовать или могут отсутствовать; когда они присутствуют, они могут быть одинаковым или могут различаться, и независимо могут представлять собой один или несколько из: слитого белка для нацеливания, например, но не ограничиваясь ими, такого как фрагмент антитела (например, одноцепочечный Fv) и/или однодоменное антитело (sdAb); средства для лучевой терапии и/или визуализирующего средства, например, но не ограничиваясь ими, радионуклида (например, ^{123}I , ^{111}In , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{124}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{57}Cu , ^{213}Bi , ^{211}At), флуоресцентного красителя (например, краситель Alexa Fluor, Cy) и/или флуоресцентной белковой метки (например, GFP, DsRed); цитотоксического средства для химиотерапии, например, но не ограничиваясь ими, доксорубицина, калихеамицина, производных майтанзиноидов (например, DM1, DM4), токсина (например, укороченный эндотоксин A *Pseudomonas*, дифтерийный токсин); носителя на основе наночастиц, например, но не ограничиваясь ими, полиэтиленгликоля (PEG), полимера, конъюгированного с лекарственным средством, наноносителя или визуализирующего средства (например, полимер N-(2-гидроксипропил)метакриламид (HPMA), глутаминовая кислота, PEG, декстран); лекарственного средства (например, но не ограничиваясь ими, доксорубицин, камптотецин, паклитаксел, палатинат); наноносителя, например, но не ограничиваясь ими, нанооболочки или липосомы; визуализирующего средства, например, но не ограничиваясь ими, супермагнитного оксида железа (SPIO); дендримера и/или твердой подложки для применения в очистке, концентрировании и секвестрации (например, наночастицы, инертные смолы, подходящие подложки на основе диоксида кремния) лиганда.

Как правило, не является предпочтительным присоединение молекул груза или вспомогательных молекул во всех возможных положениях, поскольку это может вызывать пространственные или электростатические затруднения. Однако эффекты добавления молекулы груза или вспомогательной молекулы в любое данное положение или положения на структуре можно определять стандартным образом ввиду настоящего изобретения посредством моделирования линкера между связывающими доменами и проведения моделирования методом молекулярной динамики, чтобы существенно минимизировать энергию молекулярной механики и снизить пространственную и электростатическую несовместимость между линкером и полипептидами рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета и полипептидами рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, описанными в настоящем описании.

Может быть предпочтительным добавление молекулы груза или вспомогательной молекулы к линкерной части средства, а не к связывающему домену, для снижения вероятности препятствования связывающей функции. Однако добавление к связывающему домену является возможным и может быть желательным в некоторых случаях, и эффект такого добавления можно определять стандартным образом заранее посредством моделирования связывающего соединения и линкера с предполагаемым добавлением, как описано в настоящем описании.

Способы конъюгации можно проводить с использованием коммерческих наборов, которые обеспечивают конъюгации через распространенные реакционноспособные группы, такие как первичные амины, сукцинимидильные (NHS) сложные эфиры и сульфгидрильные реакционноспособные группы. Некоторыми неограничивающими примерами являются набор для мечения белков Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen detection technologies) и наборы для пегилирования (Pierce Biotechnology Inc.).

В некоторых аспектах одноцепочечные ловушки полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета могут быть ковалентно или нековалентно связаны с одним или несколькими полипептидами рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета или полипептидами рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета, а также с дополнительными одноцепочечными ловушками лигандов полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета с образованием гетеромультимеров более высокого порядка, которые можно использовать в соответствии со способами, описанными в настоящем описании. См., например, фиг. 19. Например, одноцепочечная ловушка лигандов полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета может дополнительно содержать домен мультимеризации, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная ловушка лигандов полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета содержит константный домен иммуноглобулина Ig. Такие константные домены иммуноглобулинов могут быть выбраны для обеспечения симметричных или асимметричных комплексов, содержащих по меньшей мере одну одноцепочечную ловушку полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета:полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета.

В некоторых аспектах одноцепочечную ловушку полипептид рецептора типа I белков суперсемейства TGF-бета: полипептид рецептора типа II белков суперсемейства TGF-бета или комбинации таких ловушек можно использовать в качестве антагонистов суперсемейства TGF-бета для лечения или предупреждения обусловленного суперсемейством TGF-бета нарушения или заболевания, как описано в настоящем описании (например, заболевание почек и/или метаболическое нарушение или состояние).

Понятно, что различные элементы слитых белков (например, слитых белков Fc иммуноглобулинов) могут быть расположены в соответствии с желаемой функциональностью. Например, домен полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета может быть помещен со стороны С-конца относительно гетерологичного домена или альтернативно гетерологичный домен может быть помещен со стороны С-конца домена полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета. Домен полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета и гетерологичный домен не должны быть соседними в слитом белке и могут быть включены дополнительные домены или аминокислотные последовательности со стороны С- или N-конца любого домена или между доменами.

Например, слитый белок рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета может содержать аминокислотную последовательность в соответствии с формулой А-В-С. Часть В соответствует домену полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета. Части А и С независимо могут представлять собой ноль, одну или более одной аминокислоты, и как часть А, так и часть С, когда они присутствуют, являются гетерологичными относительно В. Части А и/или С могут быть связаны с частью В через линкерную последовательность. Линкер может быть обогащен глицином (например, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 остатка глицина) или остатками глицина и пролина и может, например, содержать одну последовательность из треонина/серина и остатков глицина или повторяющиеся последовательности треонин/серин и/или остатки глицина, например, синглеты или повторы GGG (SEQ ID NO: 58), GGGG (SEQ ID NO: 59), TGGGG (SEQ ID NO: 60), SGGGG (SEQ ID NO: 61), TGGG (SEQ ID NO: 62) или SGGG (SEQ ID NO: 63). В определенных вариантах осуществления слитый белок рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета содержит аминокислотную последовательность согласно формуле А-В-С, где А представляет собой лидерную (сигнальную) последовательность, В состоит из домена полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, и С представляет собой полипептидную часть, которая улучшает одно или несколько из стабильности *in vivo*, времени полужизни *in vivo*, захвата/введения, локализации или распределения в тканях, образования белковых комплексов и/или очистки. В определенных вариантах осуществления слитый белок рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета содержит аминокислотную последовательность согласно формуле А-В-С, где А представляет собой лидерную последовательность ТРА, В состоит из домена полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета, и С представляет собой Fc-домен иммуноглобулина. Предпочтительные слитые белки содержат аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 100, 102, 104, 106, 112, 114, 115, 117, 118, 120, 121, 123, 124, 126, 127, 129, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415 и 416.

В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению, кроме того, содержат одну или несколько гетерологичных частей (доменов), сообщающих желаемое свойство. Например, некоторые слитые домены являются особенно пригодными для выделения слитых белков посредством аффинной хроматографии. Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают, но не ограничиваются ими, полигистидин, Glu-Glu, глутатион S-трансферазу (GST), тиоредоксин, белок А, белок G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), мальтоза-связывающий белок (МВР) или сывороточный альбумин человека. Для целей аффинной очистки используют соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как конъюгированные с глутатионом, амилазой и никелем или кобальтом смолы. Многие из таких матриц являются доступными в форме "набора", таком как система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen), пригодные с партнерами по слиянию (HIS₆). В качестве другого примера слитый домен может быть выбран так, чтобы облегчать обнаружение полипептидов ловушек лигандов. Примеры таких доменов обнаружения включают различные флуоресцентные белки (например, GFP), а также "эпитопные метки", которые обычно представляют собой короткие пептидные последовательности, для которых доступно специфическое антитело. Хорошо известные эпитопные метки, для которых хорошо доступны специфические моноклональные антитела, включают FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (НА) и метки с-тус. В некоторых случаях слитые домены имеют участок расщепления протеазой, такой как для фактора Ха или тромбина, который позволяет соответствующей протеазе частично расщепить слитые белки и, тем самым, освободить от них рекомбинантные белки. Затем высвобожденные белки можно отделять от слитого домена посредством последующего хроматографического разделения.

В определенных вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению содержат одну или несколько модификаций, которые способны стабилизировать полипептиды. Например, такие модификации повышают время полужизни полипептидов *in vitro*, повышают время полужизни полипептидов в кровотоке и/или снижают протеолитическую деградацию полипептидов. Такие стабилизирующие модификации включают, но не ограни-

чиваются ими, слитые белки (включая, например, слитые белки, содержащие домен полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF-бета и стабилизирующий домен), модификации участка гликозилирования (включая, например, добавление участка гликозилирования в полипептид по изобретению) и модификации углеводной части (включая, например, удаление углеводных частей из полипептида по изобретению). Как используют в рамках изобретения, термин "стабилизирующий домен" относится не только к слитому домену (например, Fc-домен иммуноглобулина), как в случае слитых белков, но также включает небелковые модификации, такие как углеводная часть или небелковая часть, такая как полиэтиленгликоль.

В предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета для применения в соответствии со способами, описанными в настоящем описании, представляют собой выделенные полипептидные комплексы. Как используют в рамках изобретения, выделенный белок (или белковый комплекс) или полипептид (или полипептидный комплекс) представляет собой выделенный белок, который отделен от компонента его естественной среды. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс по изобретению очищен до более чем 95, 96, 97, 98 или 99% чистоты при определении, например, посредством электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрическое фокусирование (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматографии (например, ионообменная хроматография или обращено-фазовая ВЭЖХ). Способы оценки чистоты антитела хорошо известны в данной области [см., например, Flatman et al. (2007) *J. Chromatogr. B* 848:79-87]. В некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимеров по изобретению по существу свободны от гомомультимеров полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета и/или гомомультимеров полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета. Например, в некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимеров содержат менее чем приблизительно 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимеров содержат менее чем приблизительно 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимеров содержат менее чем приблизительно 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа I белков суперсемейства TGF-бета и менее чем приблизительно 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 или менее 1% гомомультимеров полипептидов рецепторов типа II белков суперсемейства TGF-бета.

В определенных вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа II и/или типа II белков суперсемейства TGF β , а также их гетеромультимерные комплексы, по изобретению можно получать различными известными в данной области способами. Например, полипептиды по изобретению можно синтезировать с использованием стандартных способов химии белков, таких как способы, описанные в *Wodansky, M. Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) и *Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Кроме того, являются коммерчески доступные автоматизированные устройства для синтеза пептидов (см., например, *Advanced ChemTech Model 396*; *Milligen/Biosearch 9600*). Альтернативно полипептиды и комплексы по изобретению, включая их фрагменты или варианты, можно продуцировать рекомбинантными способами с использованием различных экспрессирующих систем [например, *E. coli*, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS, бакуловирус], как хорошо известно в данной области. В следующем варианте осуществления модифицированные или немодифицированные полипептиды по изобретению можно получать путем расщепления продуцированных рекомбинантными способами полноразмерных полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β с использованием, например, протеазы, например, трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина или конвертирующего парные основные аминокислоты фермента (PASE). Для идентификации участков протеолитического расщепления можно использовать компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступного программного обеспечения, например, *MacVector*, *Omega*, *PCGene*, *Molecular Simulation*, Inc.).

Что касается антител, которые связывают и действуют в качестве антагонистов лигандов, которые связываются с гетеромультимерами полипептид рецептора типа I TGF-бета: полипептид рецептора типа II TGF-бета по изобретению (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин A, активин B, активин C, активин E, активин AB, активин AC, активин AE, активин BC, активин BE, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty) предусматривается, что антитело можно конструировать в качестве биспецифического антитела, содержащего первую часть, которая связывает эпитоп, такой, что первая часть антитела конкурирует за связывание с рецептором типа I, и содержащего вторую часть, которая связывается с эпитопом, таким как лиганд, так что вторая часть антитела конкурирует за связывание с рецептором типа II. Таким образом, можно конструировать биспецифическое антитело, нацеленное на один лиганд, для имитации блокады посредством двойного связывания рецептора типа I-типа II, которая может быть обеспечена гетеромультимером ALK7:ActRIIB. Аналогично предусматривается, что тот же эффект может быть достигнут с использованием комбинации двух или более

антител, где по меньшей мере первое антитело связывается с эпитопом такого лиганда, так что первое антитело конкурирует за связывание с рецептором типа I, и по меньшей мере второе антитело связывается с эпитопом такого лиганда, так что второе антитело конкурирует за связывание с рецептором типа II.

В. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β .

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим рецепторы типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β (включая их фрагменты, функциональные варианты и слитые белки), описанные в настоящем описании. Например, SEQ ID NO: 12 кодирует встречающийся в природе белок-предшественник ActRIIA человека, в то время как SEQ ID NO: 13 кодирует зрелый внеклеточный домен ActRIIA. Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно использовать, например, в способах получения гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению.

Как используют в рамках изобретения, выделенная нуклеиновая кислота (ы) относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественной среды. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат эту молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, отличающемся от ее хромосомного положения.

В определенных вариантах осуществления подразумевается, что нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β по настоящему изобретению, включают нуклеиновые кислоты, которые являются вариантами любой из SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143. Варианты нуклеотидных последовательностей включают последовательности, которые отличаются на одну или несколько нуклеотидных замен, вставок или делеций, включая аллельные варианты, и, таким образом, включают кодирующие последовательности, которые отличаются от нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143.

В определенных вариантах осуществления полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β по настоящему изобретению кодируются выделенными или рекомбинантными последовательностями нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143. Специалисту в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, комплементарным SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143, также входят в объем настоящего изобретения. В следующих вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот по изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью, или могут находиться в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143, последовательностью, комплементарной SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143 или их фрагментами. Специалисту в данной области будет хорошо понятно, что соответствующие условия жесткости, которые обеспечивают гибридизацию ДНК, могут варьироваться. Например, можно проводить гибридизацию с 6,0 \times хлоридом натрия/цитратом натрия (SSC) при приблизительно 45 $^{\circ}$ C с последующим промыванием 2,0 \times SSC при 50 $^{\circ}$ C. Например, концентрацию соли на стадии промывания можно выбирать от низкой жесткости приблизительно 2,0 \times SSC при 50 $^{\circ}$ C до высокой жесткости приблизительно 0,2 \times SSC при 50 $^{\circ}$ C. Кроме того, температуру на стадии промывания можно повышать от условий низкой жесткости при комнатной температуре, приблизительно 22 $^{\circ}$ C, до условий высокой жесткости при приблизительно 65 $^{\circ}$ C. Можно варьировать как температуру, так и концентрацию соли, или можно держать постоянной температуру или концентрацию соли, а другую переменную изменять. В одном варианте осуществления изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в условиях низкой жесткости 6 \times SSC при комнатной температуре с последую-

щим промыванием при $2 \times SSC$ при комнатной температуре.

Также в объем изобретения входят выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, указанных в SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 52, 53, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 101, 105, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140 и 143 вследствие вырожденности генетического кода. Например, ряд аминокислот обозначается более чем одним триплетом. Кодоны, которые определяют одну и ту же аминокислоты, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами для гистидина) могут приводить к "молчащим" мутациям, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако ожидается, что в клетках млекопитающих существуют полиморфизмы последовательности ДНК, которые приводят к изменениям в аминокислотных последовательностях рассматриваемых белков. Специалисту в данной области будет понятно, что эти изменения одного или нескольких нуклеотидов (вплоть до приблизительно 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать среди индивидуумов данного вида вследствие естественного аллельного варьирования. Любые и все такие варьирования нуклеотидов и итоговые аминокислотные полиморфизмы входят в объем настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессирующей конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, являются подходящими для клетки-хозяина, используемой для экспрессии. В данной области известны многочисленные типы соответствующих экспрессирующих векторов и подходящих регуляторных последовательностей для различных клеток-хозяев. Как правило, указанная одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, участки связывания рибосом, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и последовательности энхансеров и активаторов. Изобретение предусматривает конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в данной области. Промоторы могут представлять собой либо встречающиеся в природе промоторы, либо гибридные промоторы, которые сочетают в себе элементы более чем одного промотора. Экспрессирующая конструкция может находиться в клетке на эписоме, такой как плаزمид, или экспрессирующая конструкция может быть встроена в хромосому. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор содержит ген селективного маркера, который позволяет селекцию трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в данной области и варьируются в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В некоторых аспектах настоящего изобретения рассматриваемая нуклеиновая кислота предоставляется в экспрессирующем векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны в данной области, и их выбирают для контроля экспрессии полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β . Таким образом, термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. Иллюстративные регуляторные последовательности описаны в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, любые из широкого множества последовательностей контроля экспрессии, которые контролируют экспрессию последовательности ДНК, когда они функционально связаны с ней, можно использовать в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептиды рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β . Такие пригодные последовательности контроля экспрессии включают, например, ранние и поздние промоторы SV40, промотор tet, предранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессия которого контролируется РНК-полимеразой T7, главные области оператора и промотора фага лямбда, области контроля белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или другие ферменты гликолиза, промоторы кислой фосфатазы, например Pho5, промоторы α -факторов скрещивания дрожжей, промотор полиэдрона бакуловирусной системы и другие последовательности, о которых известно, что они контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и их различные комбинации. Следует понимать, что конструкция экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации и/или тип белка, экспрессия которого желательна. Более того, также следует учитывать количество копий вектора, способность контролировать это количество копий и экспрессию любого другого белка, кодируемого вектором, такого как маркерный антибиотик.

Рекомбинантную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно получать путем лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках (клетки дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих), или и в тех, и в других. Экспрессирующие носители для продукции рекомбинантного полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β включают плазмиды и другие векторы. Например, подходя-

щие векторы включают плазмиды следующих типов: происходящие из pBR322 плазмиды, происходящие из pEMBL плазмиды, происходящие из pEX плазмиды, происходящие из pBTac плазмиды и происходящие из pUC плазмиды для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые экспрессирующие векторы млекопитающих содержат как прокариотические последовательности для облегчения увеличения вектора в количестве в бактериях, так и один или несколько эукариотических транскрипционных элементов, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Векторы, происходящие из pKDNAI/amp, pKDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pNug, являются примерами экспрессирующих векторов млекопитающих, пригодных для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицированы последовательностями из бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и селекции по резистентности к лекарственному средству как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Альтернативно производные вирусов, таких как бычий вирус папилломы (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барр (pHEBo, производное pREP и p205) можно использовать для временной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных (в том числе ретровирусных) экспрессирующих систем могут быть найдены ниже в описании систем доставки для генной терапии. Различные способы, используемые для получения плазмид и трансформации организмов-хозяев, хорошо известны в данной области. Для других подходящих экспрессирующих систем как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также общих рекомбинантных методик, см., например, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях может быть желательной экспрессия рекомбинантных полипептидов с использованием бакуловирусной экспрессирующей системы. Примеры таких бакуловирусных экспрессирующих систем включают происходящие из pVL векторы (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), происходящие из pAcUW векторы (такие как pAcUW1) и происходящие из pBlueBac векторы (такие как pBlueBac III, содержащий β -gal).

В предпочтительном варианте осуществления вектор конструируют для продукции рассматриваемых полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β в клетках CHO, как например, вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wise.). Как будет понятно, рассматриваемые генные конструкции можно использовать для обеспечения экспрессии рассматриваемого полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β в клетках, увеличенных в количестве в культуре, например, для продуцирования белков, в том числе слитых белков или вариантов белков, для очистки.

Также настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансфицированной геном, включающим кодирующую последовательность для одного или нескольких рассматриваемых полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β . Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку. Например, полипептид рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β по изобретению можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетки насекомых (например, с использованием бакуловирусной экспрессирующей системы), дрожжи или клетки млекопитающих [например, клеточная линия яичника китайского хомячка (CHO)]. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к способам получения рассматриваемых полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β . Например, клетку-хозяина, трансфицированную экспрессирующим вектором, кодирующим полипептид рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β , можно культивировать в подходящих условиях для обеспечения экспрессии полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β . Полипептид может секретироваться, и его можно выделять из смеси клеток и среды, содержащей полипептид. Альтернативно полипептид рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β можно выделять из цитоплазматической или мембранной фракции, полученной из собранных и лизированных клеток. Клеточная культура включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Подходящие среды для культивирования клеток хорошо известны в данной области. Рассматриваемые полипептиды можно выделять из клеточной культуральной среды, клеток-хозяев или и тех, и других, с использованием способов очистки белков, известных в данной области, включая ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с антителами, специфичными к конкретным эпитопам полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β , и аффинную очистку с агентом, который связывается с доменом, слитым с полипептидом рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β (например, колонку с белком А можно использовать для очистки слитого белка рецептор типа I белков суперсемейства TGF β -Fc и/или рецептор типа II белков суперсемейства TGF β -Fc слитый белок). В некоторых вариантах осуществления полипептид рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β представляет собой слитый белок, содержащий домен, который облегчает его очистку.

В некоторых вариантах осуществления очистку осуществляют посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих, в любом порядке: хроматография

с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вируса и заменой буфера. Слитый белок рецептор типа I белков суперсемейства TGF β -Fc и/или рецептор типа II белков суперсемейства TGF β -Fc можно очищать до чистоты >90, >95, >96, >98 или >99% при определении посредством эксклюзионной хроматографии и >90, >95, >96, >98 или >99% при определении посредством SDS PAGE. Заданный уровень чистоты должен быть таким, чтобы он был достаточным для достижения желаемых результатов в системах млекопитающих, в частности, не являющихся человеком приматов, грызунов (мышей) и людей.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, такую как последовательность поли-(His)/участка расщепления энтерокиназа на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β может позволить очистку экспрессируемого слитого белка аффинной хроматографией с использованием смолы с металлом Ni². Затем лидерную последовательность для очистки можно удалять посредством обработки энтерокиназой с получением очищенного полипептида рецептора типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β . См., например, Hochuli et al. (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht et al. (1991) *PNAS USA* 88:8972.

Способы получения слитых генов хорошо известны. По существу, связывание различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, проводят в соответствии с общепринятыми способами с использованием тупых или выступающих концов для лигирования, расщепления ферментом рестрикции для предоставления соответствующих концов, заполнения липких концов соответствующим образом, обработки щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного связывания и ферментативного лигирования. В другом варианте осуществления слитый ген можно синтезировать общепринятыми способами, включая автоматизированные устройства для синтеза ДНК. Альтернативно можно проводить амплификацию посредством ПЦР фрагментов генов с использованием якорных праймеров, которые дают начало выступающим концам между двумя последовательными фрагментами генов, которые затем можно подвергать отжигу с получением химерной последовательности гена. См., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992.

4. Скрининговые способы анализа.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению гетеромультимерных комплексов рецепторов типа I и типа II белков суперсемейства TGF β для идентификации соединений (агентов), которые являются агонистами или антагонистами рецепторов суперсемейства TGF β . Соединения, идентифицированные посредством этого скрининга, можно исследовать для оценки их способности модулировать ткани, такие как кость, хрящ, мышца, жировая ткань и/или нейроны, для оценки их способности модулировать рост ткани *in vivo* или *in vitro*. Эти соединения можно исследовать, например, в моделях на животных.

Существуют многочисленные подходы для скрининга лекарственных средств для модулирования роста тканей посредством нацеливания на передачу сигнала лигандами суперсемейства TGF β (например, передача сигнала SMAD 2/3 и/или SMAD 1/5/8). В определенных вариантах осуществления можно проводить высокопроизводительный скрининг для идентификации средств, которые нарушают опосредуемые рецептором суперсемейства TGF β эффекты на выбранную клеточную линию. В определенных вариантах осуществления анализ проводят для скрининга и идентификации соединений, которые специфически ингибируют или снижают связывание гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета с его партнером по связыванию, таким как лиганд суперсемейства TGF β (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP1, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). Альтернативно анализ можно использовать для идентификации соединений, которые усиливают связывание гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета с его партнером по связыванию, таким как лиганд суперсемейства TGF β . В следующем варианте осуществления соединения можно идентифицировать по их способности взаимодействовать с гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению.

Различные форматы анализа являются достаточными и, ввиду настоящего изобретения, форматы анализа, явно не описанные в настоящем описании, тем не менее, будут понятны специалисту в данной области. Как описано в настоящем описании, исследуемые соединения (агенты) по изобретению можно создавать любым комбинаторным химическим способом. Альтернативно соединения могут представлять собой встречающиеся в природе биомолекулы, синтезированные *in vivo* или *in vitro*. Соединения (агенты), подлежащие исследованию в отношении их способности действовать в качестве модуляторов роста ткани, можно продуцировать, например, посредством бактерий, дрожжей, растений или других организмов (например, натуральные продукты), продуцировать химически (например, низкомолекулярные соединения, в том числе пептидомиметики) или продуцировать рекомбинантными способами. Исследуе-

мые соединения, охватываемые настоящим изобретением, включают непептидные органические молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновых кислот. В определенных вариантах осуществления исследуемый агент представляет собой низкомолекулярное органическое соединение, имеющее молекулярную массу менее чем приблизительно 2000 дальтон (Да).

Исследуемые соединения по изобретению могут быть предоставлены в качестве единичных отдельных структур или они могут быть предоставлены в более комплексных библиотеках, таких как библиотеки, полученные посредством комбинаторной химии. Эти библиотеки могут содержать, например, спирты, алкилгалогениды, амины, амиды, сложные эфиры, альдегиды, простые эфиры и другие классы органических соединений. Предоставление исследуемых соединений тестовой системе может осуществляться либо в выделенной форме, либо в качестве смесей соединений, особенно на начальных стадиях скрининга. Необязательно, соединения можно дериватизировать другими соединениями, и они могут иметь дериватирующие группы, которые облегчают выделение соединений. Неограничивающие примеры дериватирующих групп включают биотин, флуоресцеин, дигоксигенин, зеленый флуоресцентный белок, изотопы, полигистидин, магнитные гранулы, глутатион S-трансферазу (GST), светоактивируемые сшивающие агенты или любые их комбинации.

Во многих программах скрининга лекарственных средств, в которых исследуются библиотеки соединений и природных экстрактов, являются желательными высокопроизводительные способы анализа для максимизации количества соединений, изученных за данный период времени. Способы анализа, которые проводят в бесклеточных системах, таких как могут быть получены с помощью очищенных или полуочищенных белков, часто являются предпочтительными в качестве "первичного" скрининга, поскольку их можно проводить, чтобы позволить быструю разработку и относительно простое обнаружение изменения молекулярной мишени, которое опосредуется исследуемым соединением. Более того, эффекты клеточной токсичности или биодоступности исследуемого соединения обычно могут игнорироваться в системе *in vitro*, вместо этого анализ сфокусирован в основном на эффекте лекарственного средства на молекулярную мишень, который может проявляться изменением аффинности связывания между гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и его партнером по связыванию (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty).

Только для иллюстрации, в иллюстративном скрининговом анализе по настоящему изобретению представляющее интерес соединение приводят в контакт с выделенным и очищенным гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, который обычно способен связывать лиганд суперсемейства TGF-бета, в соответствии с назначением анализа. К смеси соединения и гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета затем добавляют композицию, содержащую соответствующий лиганд суперсемейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). Обнаружение и количественное определение комплексов гетеромультимер-лиганд суперсемейства обеспечивает способ определения эффективности соединения в отношении ингибирования (или усиления) образования комплекса между гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и его связывающим белком. Эффективность соединения можно оценивать путем построения кривых доза-эффект из данных, полученных с использованием различных концентраций исследуемого соединения. Более того, также можно проводить контрольный анализ для предоставления исходного уровня для сравнения. Например, в контрольном анализе выделенный и очищенный лиганд суперсемейства TGF-бета добавляют к композиции, содержащей гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и образование комплекса гетеромультимер-лиганд количественно определяют в отсутствие исследуемого соединения. Будет понятно, что, как правило, порядок, в котором реагенты можно добавлять, можно изменять, и их можно добавлять одновременно. Более того, вместо очищенных белков можно использовать клеточные экстракты и лизаты, чтобы обеспечить подходящую систему бесклеточного анализа.

Связывание гетеромультимерного комплекса белков рецепторов суперсемейства TGF-бета с другим белком можно выявлять различными способами. Например, модулирование образования комплексов можно количественно определять с использованием, например, меченных поддающейся обнаружению меткой белков, таких как радиоактивно меченный (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченный (например, FITC) или ферментативно меченный гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и/или его связывающий белок, посредством иммуноанализа или посредством хроматографического определения.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению способов анализа на основе флуоресцентной поляризации и способов анализа на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при измерении, либо прямо, либо непрямо, степени взаимодействия между гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и связывающимся с ним белком. Кроме того, другие способы обнаружения, такие как способы обнаружения на основе оптической длины волны (см., например, публикацию РСТ WO 96/26432 и патент США № 5677196), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), детекторов поверхностного заряда и детекторов поверхностного усиления, являются совместимыми со многими вариантами осуществления изобретения.

Более того, настоящее изобретение относится к применению анализа взаимодействия посредством ловушек, также известного как "двухгибридный анализ", для идентификации агентов, которые нарушают или усиливают взаимодействия между гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и его партнером по связыванию. См., например, патент США № 5283317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; и Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию обратных двухгибридных систем для идентификации соединений (например, низкомолекулярных соединений или пептидов), которые диссоциируют взаимодействия между гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и связывающимся с ним белком [см., например, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; и патенты США № 5525490; 5955280 и 5965368].

В определенных вариантах осуществления соединения по изобретению идентифицируют по их способности взаимодействовать с гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению. Взаимодействие между соединением и гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета может быть ковалентным или нековалентным. Например, такое взаимодействие можно идентифицировано на белковом уровне с использованием биохимических способов *in vitro*, включая фотополимеризацию, связывание радиоактивно меченного лиганда и аффинную хроматография. См., например, Jakoby WB et al. (1974) *Methods in Enzymology* 46:1. В определенных случаях соединения можно подвергать скринингу в анализе на основе механизма, таком как анализ для обнаружения соединений, которые связываются с гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета. Он может включать событие связывание в твердой фазе или в жидкой фазе. Альтернативно ген, кодирующий гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, можно трансфицировать с репортерной системой (например, β -галактозидаза, люцифераза или зеленый флуоресцентный белок) в клетку и подвергать скринингу против библиотеки, предпочтительно посредством высокопроизводительного скрининга или с индивидуальными членами библиотеки. Можно использовать другие способы анализа на основе механизма; например, анализы связывания, которые выявляют изменения свободной энергии. Анализы связывания можно проводить с мишенью, фиксированной на лунке, грануле или чипе, или уловленной иммобилизованным антителом или отделенной посредством капиллярного электрофореза. Связанные соединения обычно можно обнаруживать с использованием колориметрических показателей, или флуоресценции, или поверхностного плазмонного резонанса.

5. Иллюстративные терапевтические способы применения.

В определенных вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предупреждения или состояния, которое ассоциировано с аномальной активностью рецептора белков суперсемейства TGF β (например, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ALK6, ALK7, ActRIIA, ActRIIB, BMPRII, TGFBRII, и MISRII) и/или лиганда суперсемейства TGF β (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС, активин ВЕ, nodal, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). Эти заболевания, нарушения или состояния в общем называют в настоящем описании "ассоциированными с суперсемейством TGF β состояниями" или "ассоциированными с суперсемейством TGF β нарушениями". В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения у индивидуума, нуждающегося в этом, посредством введения индивидууму терапевтически эффективного количества гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинаций гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, как описано в настоящем описании. Любые из гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению потенциально можно использовать по отдельности или в комбинации для терапевтических применений, описанных в настоящем описании. Эти способы, в частности, нацелены на терапевтическое и профилактическое лечение млекопитающих, включая, например, грызунов, приматов и людей.

Как используют в рамках изобретения, терапевтическое средство, которое "предупреждает" нару-

шение или состояние, относится к соединению, которое в статистической выборке снижает встречаемость нарушения или состояния в подвергнутой лечению выборке относительно не подвергнутой лечению контрольной выборки или отсрочивает возникновение или снижает тяжесть одного или нескольких симптомов нарушения или состояния относительно не подвергнутой лечению контрольной выборки. Термин "лечение", как используют в рамках изобретения, включая смягчение или устранение состояния после его возникновения. В любом случае предупреждение или лечение может назначить при диагностике врач или другое лицо, осуществляющее уход, и исходя из предполагаемого результата введения лекарственного средства.

Комплексы рецептор белков суперсемейства TGF β -лиганд играют важнейшие роли в росте тканей, а также в процессах раннего развития, таких как правильное образование различных структур, или в одной или нескольких способностях после развития, включая половое развитие, продукцию гормонов гипофиза и образование костей и хрящей. Таким образом, ассоциированные с суперсемейством TGF β состояния/нарушения включают аномальный рост и дифференцировку тканей, такие как воспаление, аллергия, аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания и опухоли.

Иллюстративные ассоциированные с суперсемейством TGF β состояния включают нервно-мышечные нарушения (например, мышечная дистрофия и мышечная атрофия), застойное обструктивное заболевание легких (и потеря мышечной массы, ассоциированная с COPD), синдром потери мышечной массы, саркопению, кахексию, нарушения жировой ткани (например, ожирение), диабет 2 типа (NIDDM, диабет с взрослым началом) и дегенеративное заболевание костей (например, остеопороз). Другие иллюстративные ассоциированные с суперсемейством TGF β состояния включают мышечно-дегенеративные и нервно-мышечные нарушения, репарацию тканей (например, заживление ран), нейродегенеративные заболевания (например, боковой амиотрофический склероз) и иммунологические нарушения (например, нарушения, связанные с аномальной пролиферацией или функцией лимфоцитов).

В определенных вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению используют в качестве части лечения мышечной дистрофии. Термин "мышечная дистрофия" относится к группе дегенеративных мышечных заболеваний, характеризующихся постепенным ослаблением и изнашиванием скелетных мышц и иногда сердца и дыхательных мышц. Мышечные дистрофии являются генетическими нарушениями, характеризующимися прогрессирующей потерей мышечной массы и слабостью, которые начинаются с микроскопических изменений в мышце. Поскольку мышцы дегенерируют с течением времени, мышечная сила индивидуума снижается. Иллюстративные мышечные дистрофии, которые можно лечить с помощью режима, включающего рассматриваемые гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, включают мышечную дистрофию Дюшенна (DMD), мышечную дистрофию Беккера (BMD), мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса (EDMD), конечностно-поясную мышечную дистрофию (LGMD), плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FSH или FSHD) (также известную как Ландузи-Дежерина), миотоническую дистрофию (MMD; также известная как болезнь Штейнера), окулофарингеальную мышечную дистрофию (OPMD), дистальную мышечную дистрофию (DD), врожденную мышечную дистрофию (CMD).

Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) впервые была описана французским неврологом Гийомом Бенджамином Амандом Дюшенном в 1860-х годах. Мышечная дистрофия Беккера (BMD) названа в честь немецкого доктора Питера Эмиля Беккера, который впервые описал этот вариант DMD в 1950-х годах. DMD является одним из наиболее частых наследственных заболеваний у мужчин, которым страдает один из 3500 мальчиков. DMD возникает, когда ген дистрофина, расположенный на коротком плече X-хромосомы, является дефектным. Поскольку мужчины имеют только одну копию X-хромосомы, они имеют только одну копию гена дистрофина. Без белка дистрофина мышца легко повреждается во время циклов сокращения и расслабления. В то время как на ранних стадиях заболевания мышца компенсируется посредством регенерации, позднее клетки-предшественники мышц не могут справиться с продолжающимся повреждением и здоровая мышца заменяется нефункциональной фиброзно-жировой тканью.

BMD является результатом других мутаций в гене дистрофина. Пациенты с BMD имеют некоторый дистрофин, однако либо в недостаточном количестве, либо плохого качества. Присутствие некоторого дистрофина защищает мышцы пациентов с BMD от настолько тяжелой и настолько быстрой дегенерации, как у пациентов с DMD.

Исследования на животных показывают, что ингибирование каскада передачи сигнала GDF8 может эффективно лечить различные аспекты заболевания у пациентов с DMD и BMD (Bogdanovich et al., 2002, Nature 420:418-421; Pistilli et al., 2011, Am J Pathol 178:1287-1297). Таким образом, гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению могут действовать в качестве ингибиторов (антагонистов) GDF8 и являются альтернативными средствами блокирования передачи сигнала посредством GDF8 и/или родственных лигандов суперсемейства TGF β in vivo у пациентов с DMD и BMD.

Аналогично, гетеромультимерные комплексы рецепторов белков TGF-бета по изобретению могут обеспечить эффективные средства повышения мышечной массы при других заболеваниях, при которых

необходим рост мышц. Например, боковой амиотрофический склероз (ALS), также называемый болезнью Лу Геринга или болезнь двигательного нейрона представляет собой хроническое прогрессирующее и неизлечимое нарушение ЦНС, которое атакует двигательные нейроны, которые являются компонентами центральной нервной системы, требуемыми для инициации сокращения скелетных мышц. При ALS двигательные нейроны повреждаются и в конечном итоге погибают, и хотя головной мозг индивидуума обычно остается полностью функционирующим и находится в ясном сознании, инициация сокращения мышц блокируется на уровне спинного мозга. Возраст индивидуумов, у которых развивается ALS, как правило, составляет от 40 до 70 лет и первыми дегенерируют двигательные нейроны, которые иннервируют руки или ноги. Пациенты с ALS имеют затруднение при ходьбе, могут ронять вещи, падать, неотчетливо говорить или неконтролируемо смеяться или кричать. По мере прогрессирования заболевания мышцы конечностей начинают атрофироваться вследствие неиспользования. Мышечная слабость становится истощающей и пациентам требуется кресло-каталка или они становятся прикованными к постели. Большинство пациентов с ALS погибают вследствие дыхательной недостаточности или от осложнений искусственной вентиляции, таких как пневмония, через 3-5 лет после возникновения заболевания.

Обеспечение увеличенной мышечной массы посредством гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета также может быть полезным для индивидуумов, страдающих заболеваниями, связанными с потерей мышечной массы. Gonzalez-Cadavid et al. (выше) сообщили, что экспрессия GDF8 обратно коррелирует с безжировой массой тела у человека, и что увеличенная экспрессия гена GDF8 ассоциирована со снижением массы тела у мужчин с синдромом истощения при СПИД. Посредством ингибирования функции GDF8 у пациентов с СПИД можно смягчать по меньшей мере некоторые симптомы СПИД, или даже полностью устранять, таким образом, значительно улучшая качество жизни у пациентов со СПИД.

Поскольку потеря функции GDF8 также ассоциирована со снижением жировой массы без уменьшения употребления питательных веществ (Zimmers et al., выше; McPheggon и Lee, выше), рассматриваемые гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, кроме того, можно использовать в качестве лекарственных средств для замедления или предупреждения развития ожирения и диабета 2 типа.

Синдром анорексии-кахексии при злокачественной опухоли относится к наиболее истощающим и угрожающим жизни аспектам злокачественной опухоли. Этот синдром является частым признаком многих типов злокачественной опухоли - присутствует приблизительно у 80% пациентов со злокачественной опухолью на момент смерти - и он ответственен не только за низкое качество жизни и плохой ответ на химиотерапию, но также и за более короткое время выживания, чем у пациентов со сравнимыми опухолями, но без снижения массы тела. Кахексию обычно предполагают у пациентов со злокачественной опухолью, если происходит ненамеренное снижение массы тела, превышающее пять процентов от массы тела до заболевания в течение шести месяцев. Ассоциированная с анорексией, потерей жировой и мышечной ткани и психологическим страданием, кахексия является результатом комплексного взаимодействия между злокачественной опухолью и хозяином. Кахексия при злокачественной опухоли влияет на продукцию цитокинов, высвобождение мобилизующих липиды и индуцирующих протеолиз факторов и изменения промежуточного метаболизма. Хотя анорексия является частой, снижение употребления пищи отдельно неспособно вызвать изменения в составе тела, наблюдаемые у пациентов со злокачественной опухолью, и увеличение употребления питательных веществ неспособно обратить вспять синдром истощения. В настоящее время отсутствует лечение для контроля или обращения вспять кахектических процессов. Поскольку было обнаружено, что системная сверхэкспрессия GDF8 у взрослых мышей индуцирует выраженную потерю мышц и жира, аналогичную с той, что наблюдается при синдромах кахексии у человека (Zimmers et al., выше), фармацевтические композиции рассматриваемого гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета можно с пользой использовать для предупреждения, лечения или смягчения симптомов синдрома кахексии, где является желательным рост мышц. Примером гетеромультимерного комплекса, пригодного для предупреждения, лечения или смягчения снижения мышечной массы, как описано выше, является ActRIIB-Fc:ALK4-Fc.

В определенных вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать в способах индукции образования костей и/или хрящей, предупреждения снижения костной массы, увеличения минерализации костей, предупреждения деминерализации костей и/или повышения плотности костей. Гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета могут использоваться у пациентов, у которых диагностировано субклиническое снижение плотности костей в качестве защитной меры против развития остеопороза.

В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению могут использоваться в медицине для заживления переломов костей и дефектов хрящей у человека и других животных. Рассматриваемые способы и композиции также могут иметь профилактическое применение для уменьшения вероятности закрытых, а также открытых

переломов, а также для улучшения фиксации искусственных суставов. Образование костей *de novo*, индуцированное остеогенным агентом, является пригодным для репарации черепно-лицевых дефектов, которые являются врожденными, индуцированными травмой или вызванными резекцией злокачественной опухоли, и также являются пригодным в косметической пластической хирургии. Кроме того, способы и композиции по изобретению можно использовать для лечения заболевания пародонта и для других процессов репарации зубов. В определенных случаях гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета могут обеспечить среду для привлечения образующих кости клеток, стимуляции роста образующих кости клеток или индукции дифференцировки предшественников образующих кости клеток. Гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению также могут использоваться для лечения остеопороза. Кроме того, гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета могут использоваться в репарации дефектов хрящей и предупреждения/обращения вспять остеоартрита. Примерами гетеромультимерных комплексов, пригодными для индукции образования кости, предупреждения снижения костной массы, увеличения минерализации костей, предупреждения деминерализации костей и/или увеличения плотности костей, как описано выше, являются ActRIIB-Fc:ALK3-Fc и ActRIIB-Fc:ALK4-Fc.

В Rosen et al. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 7th ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C. (включенная в настоящее описание в качестве ссылки) предоставлено широкое обсуждение нарушений костей, которые могут быть подвергнуты лечению гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинациями гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета. В настоящем описании предоставлен частичный перечень. Способы и композиции по изобретению можно применять при состояниях, характеризующихся или вызывающих снижение костной массы, такое как остеопороз (включая вторичный остеопороз), гиперпаратиреоз, хроническое заболевание почек, минеральное нарушение костей, лишение или снижение уровня половых гормонов (например, андрогенов и/или эстрогена), лечение глюкокортикоидами, ревматоидный артрит, тяжелые ожоги, гиперпаратиреоз, гиперкальцемия, гипокальцемия, гипофосфатемия, остеомалация (включая индуцированную опухолью остеомалацию), гиперфосфатемия, дефицит витамина D, гиперпаратиреоз (включая семейный гиперпаратиреоз) и псевдогипопаратиреоз, метастазы опухоли в кость, снижение костной массы вследствие опухоли или химиотерапии, опухоли костей и костного мозга (например, множественная миелома), ишемические нарушения костей, заболевания пародонта и снижение массы костей полости рта, болезнь Кушинга, болезнь Педжета, тиреотоксикоз, хроническая диарея или мальабсорбция, почечноканальцевый ацидоз или нервная анорексия. Способы и композиции по изобретению также можно применять при состояниях, характеризующихся нарушением образования или заживления костей, включая несращение переломов, переломы, которые по иной причине медленно заживают, дисплазии костей плода и новорожденных (например, гипокальцемия, гиперкальцемия, дефекты рецепторов кальция и дефицит витамина D), остеонекроз (включая остеонекроз челюсти) и несовершенный остеогенез. Кроме того, анаболические эффекты приведут к тому, что такие антагонисты будут уменьшать боль в костях, ассоциированную с повреждением или эрозией кости. Вследствие антирезорбтивных эффектов такие антагонисты могут быть пригодными для лечения нарушений, обусловленных аномальным образованием костей, таких как метастазы остеобластных опухолей (например, ассоциированные с первичным раком предстательной железы или раком молочной железы), остеогенная остеосаркома, остеопетроз, прогрессирующая диафизарная дисплазия, внутрикостный гиперостоз, остеопойкилоз и мелорееостоз. Другие нарушения, которые можно лечить включают фиброзную дисплазию и хондродисплазии.

В другом конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу терапии и композиции для репарации переломов и других состояний, связанных с дефектами хрящей и/или костей или заболеваниями пародонта. Кроме того, изобретение относится к способам терапии и композициям для заживления ран и репарации тканей. Типы ран включают, но не ограничиваются ими, ожоги, порезы и язвы. См., например, публикацию РСТ № WO 84/01106. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного гетеромультимерного комплекса рецептора белков суперсемейства TGF-бета по изобретению в смеси с фармацевтически приемлемым наполнителем, носителем или матриксом.

В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать при состояниях, вызывающих снижение костной массы, таких как остеопороз, гиперпаратиреоз, болезнь Кушинга, тиреотоксикоз, хроническая диарея или мальабсорбция, почечноканальцевый ацидоз или нервная анорексия. Является общепризнанным, что женский пол, наличие низкой массы тела и малоподвижный образ жизни являются факторами остеопороза (снижение минеральной плотности костей, ведущее к риску переломов). Однако остеопороз также может быть результатом длительного применения определенных лекарственных средств. Остеопороз вследствие лекарственных средств или другого медицинского состояния известен как вторичный остеопороз. При болезни Кушинга избыточное количество кортизола, продуцируемого организмом, приводит к ос-

теопорозу и переломам. Наиболее распространенными лекарственными средствами, ассоциированными с вторичным остеопорозом, являются кортикостероиды, класс лекарственных средств, которые действуют подобно кортизолу, гормону, в природе продуцируемому надпочечниками. Хотя для развития скелета требуются достаточные уровни гормонов щитовидной железы, избыток гормонов щитовидной железы может снижать костную массу с течением времени. Антациды, которые содержат алюминий, могут приводить к снижению костной массы при употреблении в высоких дозах людьми, имеющими проблемы с почками, в частности, людьми, подвергающимися диализу. Другие лекарственные средства, которые могут вызывать вторичный остеопороз, включают фенитоин (Дилантин) и барбитураты, которые используются для предупреждения судорог; метотрексат (Ревматекс, Иммунокс, Фолекс, PFS), лекарственное средство от некоторых форм артрита, злокачественных опухолей и иммунных нарушений; циклоспорин (Сандиммун, Неорал), лекарственное средство, используемое для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний и для подавления иммунной системы у пациентов с трансплантатами органов; агонисты рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (Люпрон, Золадекс), используемые для лечения рака предстательной железы и эндометриоза; гепарин (Кальципарин, Ликваемин), противосвертывающие средства и холестирамин (Квестран) и колестилол (Колестид), используемые для лечения высокого уровня холестерина. Снижение костной массы вследствие терапии злокачественной опухоли является общеизвестным и называется индуцированным терапией злокачественной опухолью снижением костной массы (СТИВЛ). Метастазы в кости могут создавать полости в костях, которые могут быть скорректированы лечением гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета. Снижение костной массы также может быть вызвано заболеванием десен, хронической инфекцией, при которой бактерии, расположенные в углублениях десны, продуцируют токсины и вредоносные ферменты.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам и лекарственным средствам для лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с аномальным или нежелательным ростом костей. Например, пациенты с врожденным нарушением прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазией (FOP) имеют прогрессирующий эктопический рост костей в мягких тканях спонтанно или в ответ на травму ткани с существенным влиянием на качество жизни. Кроме того, аномальный рост костей может происходить после хирургической операции по эндопротезированию тазобедренного сустава и, таким образом, ухудшить исход хирургической операции. Это является более частым примером патологического роста костей и ситуации, в которой способы и композиции по настоящему изобретению могут быть терапевтически полезными. Те же способы и композиции также могут использоваться для лечения других форм аномального роста костей (например, патологический рост кости после травмы, ожогов или травмы спинного мозга) и для лечения или предупреждения нежелательных состояний, ассоциированных с аномальным ростом костей, наблюдаемым в связи с метастазирующим раком предстательной железы или остеосаркомой.

В определенных вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать для стимуляции образования костей у пациентов со злокачественной опухолью. Пациенты, имеющие определенные опухоли (например, предстательной железы, молочной железы, множественная миелома или любая опухоль, вызывающая гиперпаратиреоз), имеют высокий риск снижения костной массы вследствие индуцированного опухолью снижения костной массы, метастазов в кость и лекарственных средств. Таких пациентов можно лечить гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацией комплексов даже в отсутствие признаков снижения костной массы или метастазов в кость. Также можно проводить мониторинг пациентов в отношении признаков снижения костной массы или метастазов в кость, и их можно лечить гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета в случае, когда показатели указывают на увеличенный риск. Как правило, для оценки изменений плотности кости используют сканирование DEXA, в то время как индикаторы ремоделирования костей можно использовать для оценки вероятности метастазирования в кости. Можно проводить мониторинг сывороточных маркеров. Специфическая щелочная фосфатаза костей (BSAP) представляет собой фермент, который присутствует в остеобластах. Уровни BSAP в крови увеличены у пациентов с метастазами в кость и другими состояниями, которые приводят к увеличенному ремоделированию костей. Пептиды остеокальцина и проколлагена также ассоциированы с образованием костей и метастазами в кость. Повышение BSAP было обнаружено у пациентов с метастазированием в кость, вызванным раком предстательной железы, и в меньшей степени с метастазированием в кость при раке молочной железы. Уровни BMP7 являются высокими при раке предстательной железы, который метастазировал в кость, но не в метастазах в кость вследствие рака мочевого пузыря, кожи, печени или легкого. С-концевой телопептид типа I (ICTP) является сшивающим агентом, встречающимся в коллагене, который образуется в ходе резорбции кости. Поскольку кость постоянно разрушается и вновь образуется, ICTP обнаруживается по всему организму. Однако в области метастаза в кость его уровень будет значительно более высоким, чем в области нормальной кости. ICTP был обнаружен на высоких уровнях в метастазах в кость вследствие рака предстательной железы, легкого и молочной железы. Другой сшивающий агент коллагена N-концевой телопептид типа I (NTx) продуцируется вместе с ICTP в процессе обновления кости. Количество NTx возрастает

в метастазах в кость, вызванных многими различными типами злокачественной опухоли, включая рак легкого, предстательной железы и молочной железы. Также уровни NTx возрастают по мере прогрессирующего метастазирования в кость. Таким образом, этот маркер можно использовать как для обнаружения метастазов, так и для определения степени заболевания. Другие маркеры резорбции включают пиридинолин и дезоксипиридинолин. Любое повышение маркеров резорбции или маркеров метастазирования в кость указывает на необходимость терапии гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацией гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета у пациента.

Гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно вводить совместно с другими активными в отношении костей фармацевтическими средствами. Совместное введение можно проводить посредством введения в одном совместном составе, посредством одновременного введения или посредством введения в разное время. Гетеромультимерные комплексы белков рецепторов суперсемейства TGF-бета могут быть особенно эффективными при введении с другими активными отношениями костей средствами. Для пациента может быть полезным введение гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета совместно с приемом добавок кальция, витамина D, соответствующей физической нагрузкой и/или в некоторых случаях другими лекарственными средствами. Примеры других лекарственных средств включают бисфосфонаты (алендронат, ибандронат и ризедронат), кальцитонин, эстрогены, паратиреоидный гормон и ралоксифен. Бисфосфонаты (алендронат, ибандронат и ризедронат), кальцитонин, эстрогены и ралоксифен влияют на цикл ремоделирования кости и их относят к антирезорбтивным средствам. Ремоделирование кости состоит из двух отдельных стадий: резорбция кости и образование кости. Антирезорбтивные средства замедляют или останавливают резорбирующую кость часть цикла ремоделирования кости, но не замедляют образующую кость часть цикла. В результате образование новой кости продолжается с большей скоростью, чем резорбция кости и плотности кости может увеличиваться с течением времени. Терапия паратиреоидного гормона, увеличивает скорость образования кости в цикле ремоделирования кости. Алендронат одобрен как для предупреждения (5 мг в сутки или 35 мг один раз в неделю), так и для лечения (10 мг в сутки или 70 мг один раз в неделю) постменопаузального остеопороза. Алендронат уменьшает потерю костной массы, повышает плотность костей и снижает риск переломов костей, запястья и бедра. Алендронат также одобрен для лечения индуцированного глюкокортикоидами остеопороза у мужчин и женщин в результате длительного применения этих лекарственных средств (т.е. преднизон и кортизон) и для лечения остеопороза у мужчин. Алендронат плюс витамин D одобрены для лечения остеопороза у женщин в постменопаузальный период (70 мг один раз в неделю плюс витамин D) и для лечения для увеличения костной массы у мужчин с остеопорозом. Ибандронат одобрен для предупреждения и лечения постменопаузального остеопороза. Принимаемый в качестве пилюли для приема один раз в месяц (150 мг), ибандронат необходимо принимать в один и тот же день каждый месяц. Ибандронат уменьшает потерю костной массы, увеличивает плотность костей и снижает риск переломов позвоночника. Ризедронат одобрен для предупреждения и лечения постменопаузального остеопороза. Принимаемый каждые сутки (доза 5 мг) или раз в неделю (доза 35 мг или доза 35 мг с кальцием), ризедронат замедляет снижение костной массы, увеличивает плотность костей и снижает риск переломов позвоночника и не позвоночника. Ризедронат также одобрен для применения мужчинами и женщинами для предупреждения и/или лечения индуцированного глюкокортикоидами остеопороза, который является результатом длительного применения этих лекарственных средств (т.е. преднизона или кортизона). Кальцитонин представляет собой встречающийся в природе гормон, вовлеченный в регуляцию кальция и метаболизм костей. У женщин более чем через 5 лет после менопаузы кальцитонин замедляет снижение костной массы, повышает плотность костей позвоночника и может смягчать боль, ассоциированную с переломами костей. Кальцитонин доступен в качестве инъекции (50-100 МЕ каждые сутки) или назального спрея (200 МЕ каждые сутки).

Пациенту также может быть полезно совместное введение гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета и дополнительных активных в отношении костей средств. Терапия эстрогеном (ЕТ)/гормональная терапия (НТ) одобрены для предупреждения остеопороза. Было показано, что ЕТ уменьшает потерю костной массы, повышает плотность костей как в позвоночнике, так и в бедренной кости, и снижает риск переломов бедренной кости и позвоночника у женщин в постменопаузальном периоде. ЕТ наиболее часто вводят в форме пилюль или кожного пластыря, который доставляет низкую дозу приблизительно 0,3 мг каждые сутки или стандартную дозу приблизительно 0,625 мг каждые сутки и является эффективным, даже когда его начинают принимать в возрасте старше 70 лет. Когда эстроген принимают отдельно, он может увеличить риск у женщины развития рака выстилки матки (рак эндометрия). Для устранения этого риска, лица, обеспечивающие уход, назначают гормон прогестин в комбинации с эстрогеном (гормон-заместительная терапия или НТ) для женщин, которые имеют интактную матку. ЕТ/НТ смягчают симптомы менопаузы и было показано, что они имеют благоприятный эффект на здоровье костей. Побочные эффекты могут включать вагинальное кровотечение, болезненность

молочных желез, колебания настроения и заболевания желчного пузыря. Ралоксифен, 60 мг в сутки, одобрен для предупреждения и лечения постменопаузального остеопороза. Он относится к классу лекарственных средств, называемых селективными модуляторами рецепторов эстрогена (SERM), которые были разработаны для обеспечения благоприятных эффектов эстрогенов без их потенциальных недостатков. Ралоксифен увеличивает костную массу и снижает риск переломов костей. В настоящее время еще не доступны данные, демонстрирующие, что ралоксифен может снижать риск переломов бедренной кости или других переломов костей не позвоночника. Терапаратид, форма паратиреоидного гормона, одобрен для лечения остеопороза у женщин в постменопаузальный период и у мужчин с высоким риском перелома. Это лечение стимулирует образование новой кости и значительно повышает минеральную плотность костей. У женщин в постменопаузальный период снижение частоты переломов отмечалось в позвоночнике, бедренной кости, ступне, ребрах и запястье. У мужчин снижение частоты переломов отмечалось в позвоночнике, однако отсутствовали достаточные данные для оценки снижения частоты переломов в других областях. Терапаратид вводится самостоятельно в качестве инъекции каждые сутки в течение вплоть до 24 месяцев.

В других вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета можно использовать для регуляции содержания жира в организме животного и для лечения или предупреждения, связанного с ним, и в частности, ухудшающих здоровье состояний, связанных с ним. В соответствии с настоящим изобретением регуляция (контроль) массы тела может относиться к уменьшению или увеличению массы тела, уменьшению или увеличению скорости набора массы или к увеличению или уменьшению скорости потери массы, и также включает активное поддержание или не изменение в значительной степени массы тела (например, направленное против внешних или внутренних воздействий, которые могут в ином случае увеличить или снизить массу тела). Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к регуляции массы тела посредством введения животному (например, человеку), нуждающемуся в этом, гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать для снижения массы тела и/или для снижения скорости набора массы у животного и более конкретно для лечения или смягчения ожирения у пациентов, имеющих риск или страдающих ожирением. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения относится к способам и соединениям для лечения животного, которое неспособно прибавить или сохранить вес (например, животное с синдромом истощения). Такие способы являются эффективными для увеличения веса и/или массы тела, или для снижения потери веса и/или массы, или для улучшения состояний, ассоциированных или вызванных нежелательно низким (например, болезненным) весом и/или массой тела. Кроме того, нарушения, обусловленные высоким уровнем холестерина (например, гиперхолестеринемия или дислипидемия) можно лечить гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинациями гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению.

В некоторых аспектах гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацию гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать для повышения уровней эритроцитов, лечения или предупреждения анемии, и/или лечения или предупреждения неэффективного эритропоэза у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацию гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с общепринятыми терапевтическими подходами для повышения уровней эритроцитов, в частности, подходами, используемыми для лечения анемий многофакторной этиологии. Общепринятые терапевтические подходы для повышения уровней эритроцитов включают, например, трансфузию эритроцитов, введение одного или нескольких активаторов рецепторов EPO, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, иммунодепрессивные биологические средства и лекарственные средства (например, кортикостероиды). В определенных вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацию гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предупреждения неэффективного эритропоэза и/или нарушений, ассоциированных с неэффективным эритропоэзом, у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацию гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с общепринятыми терапевтическими подходами для лечения или предупреждения анемии или нарушения, обусловленного неэффективным эритропоэзом, в частности, с терапевтическими подходами, используемыми для лечения анемий многофакторного происхождения.

Как правило, лечение или предупреждение заболевания или состояния, как описано в настоящем описании, осуществляют путем введения гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинации гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению в "эффективном количестве". Эффективное количество средства относится к количеству, эффективному, в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. "Терапевтически эффективное количество" средства по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, пол, возраст и масса тела индивидуума, и способность средства индуцировать желаемый ответ у индивидуума. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата.

В определенных вариантах осуществления гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацию гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO, можно использовать для повышения уровней эритроцитов, гемоглобина или ретикулоцитов у здоровых индивидуумов и в отдельных популяциях пациентов. Примеры соответствующих популяций пациентов включают пациентов с нежелательно низкими уровнями эритроцитов или гемоглобина, таких как пациенты, имеющие анемию, и пациентов, имеющих риск развития нежелательно низких уровней эритроцитов или гемоглобина, таких как пациенты, которым предстоит обширное оперативное вмешательство или другие процедуры, которые могут привести к значительной кровопотере. В одном варианте осуществления пациента с достаточными уровнями эритроцитов лечат гетеромультимерным комплексом рецепторов белков суперсемейства TGF-бета или комбинацией гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета для повышения уровней эритроцитов, а затем кровь отбирают и сохраняют для последующего применения в переливаниях.

Один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO можно использовать для повышения уровней эритроцитов, уровней гемоглобина и/или уровней гематокрита у пациента, имеющего анемию. При исследовании уровней гемоглобина и/или гематокрита у человека уровень меньше нормы для соответствующего возраста и пола может указывать на анемию, хотя учитываются индивидуальные отличия. Например, уровень гемоглобина 10-12,5 г/дл и, как правило, приблизительно 11,0 г/дл считается входящим в нормальный диапазон здоровых взрослых, хотя, с точки зрения терапии, более низкий уровень может вызвать меньше сердечно-сосудистых побочных эффектов [см., например, Jacobs et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19]. Альтернативно уровни гематокрита (процент объема образца крови, занимаемый клетками) можно использовать в качестве показателей анемии. Уровни гематокрита для здоровых индивидуумов находятся в диапазоне приблизительно 41-51% для взрослых мужчин и 35-45% для взрослых женщин. В определенных вариантах осуществления пациента можно лечить посредством режима дозирования, предназначенного для восстановления уровня у пациента эритроцитов, гемоглобина и/или гематокрита до заданного уровня. Поскольку уровни гемоглобина и гематокрита варьируются от индивидуума к индивидууму, оптимально, заданный уровень гемоглобина и/или гематокрита может быть индивидуальным для каждого пациента.

Анемию часто наблюдают у пациентов, имеющих повреждение ткани, инфекцию и/или хроническое заболевание, в частности, злокачественную опухоль. У некоторых индивидуумов анемия отличается низкими уровнями эритропоэтина и/или недостаточным ответом на эритропоэтин в костном мозге [см., например, Adamson (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634]. Потенциальные причины анемии включают, например, кровопотерю, пищевые дефициты (например, сниженное употребление белка в рационе), реакцию на терапию, различные проблемы, ассоциированные с костным мозгом, и многие заболевания. Более конкретно, анемия ассоциирована с различными нарушениями и состояниями, которые включают, например, трансплантацию костного мозга; солидные опухоли (например, рак молочной железы, рак легкого и рак толстого кишечника); опухоли лимфатической системы (например, хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина); опухоли гемопоэтической системы (например, лейкоз, миелодиспластический синдром и множественная миелома); лучевую терапию; химиотерапию (например, режимы, включающие платину); воспалительные и аутоиммунные заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, ревматоидный артрит, другие воспалительные артриты, системную красную волчанку (SLE), острые или хронические заболевания кожи (например, псориаз), воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит); острое или хроническое заболевание или недостаточность почек, включая идиопатические и врожденные состояния; острое или хроническое заболевание печени; острое или хроническое кровотечение; ситуации, в которых трансфузия эритроцитов является невозможной вследствие аллоантител или аутоантител и/или по религиозным причинам (например, некоторые свидетели Иеговы); инфекции (например, малярия и остеомиелит); гемоглобинопатии, включающие, например, серповидноклеточную анемию (анемия), талассемию; употребление наркотиков или пристрастие (например, злоупотребление алкоголем); педиатрических пациентов с анемией любой причины, чтобы избежать переливания; и

пожилых пациентов или пациентов с основными сердечно-легочными заболеваниями, которым нельзя провести переливание вследствие угрозы перегрузки кровообращения [см., например, Adamson (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634]. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать для лечения или предупреждения анемии, ассоциированной с одним или несколькими из нарушений или состояний, описанных в настоящем описании.

Множество факторов может вносить вклад в обусловленную злокачественной опухолью анемию. Некоторые из них ассоциированы с самим процессом заболевания и образованием воспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, интерферон-гамма и фактор некроза опухоли [Bron et al. (2001) *Semin Oncol* 28 (Suppl 8): 1-6]. Среди эффектов воспаления, оно индуцирует ключевой регулирующий железо пептид гепцидин, тем самым ингибируя экспорт железа из макрофагов и в общем ограничивая доступность железа для эритропоэза [см., например, Ganz (2007) *J Am Soc Nephrol* 18:394-400]. Кровопотеря посредством различных путей также может вносить вклад в обусловленную злокачественной опухолью анемию. Распространенность анемии вследствие прогрессирования злокачественной опухоли варьируется в зависимости от типа злокачественной опухоли, находясь в диапазоне от 5% при раке предстательной железы вплоть до 90% при множественной миеломе. Обусловленная злокачественной опухолью анемия имеет значительные последствия для пациентов, включая усталость и ухудшение качества жизни, снижение эффективности лечения и повышение смертности. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO можно использовать для лечения обусловленной злокачественной опухолью анемии.

Гипопролиферативная анемия может быть результатом первичной дисфункции или недостаточности костного мозга.

Гипопролиферативные анемии включают: анемию вследствие хронического заболевания, анемию вследствие заболевания почек, анемию, ассоциированную с гипометаболическими состояниями и анемию, ассоциированную со злокачественной опухолью. В каждом из этих типов уровни эндогенного эритропоэтина являются несообразно низкими для наблюдаемой степени анемии. Другие гипопролиферативные анемии включают: железодефицитную анемию ранней стадии и анемию, вызванную повреждением костного мозга. В этих типах уровни эндогенного эритропоэтина являются повышенными соответственно наблюдаемой степени анемии. Показательными примерами являются миелосупрессия, вызванная злокачественной опухолью, и/или химиотерапевтическими средствами, или лучевой терапией злокачественной опухоли. В широком обзоре клинических испытаний показал, что мягкая анемия может происходить у 100% пациентов после химиотерапии, в то время как более тяжелая анемия происходит у вплоть до 80% таких пациентов [см., например, Groopman et al. (1999) *J Natl Cancer Inst* 91:1616-1634]. Миелосупрессивные лекарственные средства включают, например: 1) алкилирующие средства, такие как азотистые иприты (например, мелфалан) и соединения нитрозомочевины (например, стрептозоцин); 2) антиметаболиты, такие как антагонисты фолиевой кислоты (например, метотрексат), аналоги пуринов (например, тиогуанин) и аналоги пиримидинов (например, гемцитабин); 3) цитотоксические антибиотики, такие как антрациклины (например, доксорубин); 4) ингибиторы киназ (например, gefitinib); 5) ингибиторы митоза, такие как таксаны (например, паклитаксел) и алкалоиды барвинка (например, винорелбин); 6) моноклональные антитела (например, ритуксимаб) и 7) ингибиторы топоизомеразы (например, топотекан и эпоподид). Кроме того, состояния, приводящие к гипометаболической скорости обмена веществ, могут вызывать гипопролиферативную анемию от мягкой до умеренной. К таким состояниям относятся эндокринные дефицитные состояния. Например, анемия может возникать при болезни Аддисона, гипотиреозе, гиперпаратиреозе или у мужчин, которые кастрированы или которых лечат эстрогеном. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO, можно использовать для лечения гиперпролиферативной анемии.

Хроническое заболевание почек иногда ассоциировано с гипопролиферативной анемией, и тяжесть анемии варьируется в зависимости от уровня нарушения почек. Такая анемия в основном является следствием недостаточной продукции эритропоэтина и сниженного выживания эритроцитов. Хроническое заболевание почек обычно прогрессирует постепенно в течение периода, длящегося годы или десятилетия, заболевания конечной стадии (стадия 5), на которой для выживания пациента требуется диализ или трансплантация почки. Анемия часто развивается рано в этом процессе и ухудшается по мере прогрессирования заболевания. Клинические последствия анемии при заболевании почек подтверждены документально и включают развития гипертрофии левого желудочка, нарушение когнитивной функции, снижение качества жизни и изменение иммунной функции [см., например, Levin et al. (1999) *Am J Kidney Dis* 27:347-354; Nissenson (1992) *Am J Kidney Dis* 20 (Suppl 1):21-24; Revicki et al. (1995) *Am J Kidney Dis* 25:548-554; Gafter et al. (1994) *Kidney Int* 45:224-231]. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептором EPO, можно использовать для лечения анемии, ассоциированной с острым или хроническим заболеванием или недостаточностью почек.

Анемия вследствие острой кровопотери достаточного объема, например, вследствие травмы или послеродового кровотечения, известна как острая постгеморрагическая анемия. Острая кровопотеря первоначально вызывает гиповолемию без анемии, поскольку истощение RBC пропорционально другим компонентам крови. Однако гиповolemия быстро запускает физиологические механизмы, которые перемещают жидкость из внесосудистых в сосудистые отделы, что приводит к гемодилюции и анемии. При хронической кровопотере постепенно истощаются запасы железа в организме и в конечном итоге это приводит к дефициту железа. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO, можно использовать для лечения анемии вследствие острой кровопотери.

Железодефицитная анемия является конечной стадией постепенного прогрессирования возрастающего дефицита железа, который включает отрицательный баланс железа и железодефицитный эритропоэз в качестве промежуточных стадий. Дефицит железа может быть результатом увеличенной потребности в железе, сниженного поступления железа или увеличенной потери железа, которые иллюстрируются состояниями, такими как беременность, несбалансированный рацион, мальабсорбция кишечника, острое или хроническое воспаление и острая или хроническая кровопотеря. В случае анемии этого типа от мягкой до умеренной костный мозг остается гипопролиферативным и морфология RBC по большей части является нормальной; однако даже мягкая анемия может приводить к некоторым микроцитарным гипохромным RBC и переход в тяжелую железодефицитную анемию сопровождается гиперпролиферацией костного мозга и все в большей степени преобладающими микроцитарными и гипохромными RBC [см., например, Adamson (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634]. Соответствующая терапия железодефицитной анемии зависит от ее причины и тяжести, причем пероральные препараты железа, парентеральные составы железа и трансфузия RBC являются основными общепринятыми вариантами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO можно использовать для лечения хронического дефицита железа.

Миелодиспластический синдром (MDS) представляет собой разнообразный набор гематологических состояний, характеризующихся неэффективной продукцией миелоидных клеток крови и риском трансформации в острый миелогенный лейкоз. У пациентов с MDS стволовые клетки крови не созревают в здоровые эритроциты, лейкоциты или тромбоциты. Нарушения при MDS включают, например, рефрактерную анемию, рефрактерную анемию с кольцевидными сидеробластами, рефрактерную анемию с избытком бластных клеток, рефрактерную анемию с избытком бластных клеток в трансформации, рефрактерную цитопению с дисплазией множества ростков и миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной аномалией хромосомы 5q. Поскольку эти нарушения проявляются как необратимые дефекты как количества, так и качества кроветворных клеток, большинство пациентов с MDS страдают хронической анемией. Таким образом, пациентам MDS в конечном итоге требуются переливания крови и/или лечение факторами роста (например, эритропоэтин или G-CSF) для повышения уровня эритроцитов. Однако у многих пациентов с MDS развиваются побочные эффекты вследствие частоты такой терапии. Например, у пациентов, которым проводят частую трансфузию эритроцитов, может происходить повреждение тканей и органов вследствие накопления избыточного железа. Таким образом, один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать для лечения пациентов, имеющих MDS. В определенных вариантах осуществления пациентов, страдающих MDS, можно лечить с использованием одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO. В других вариантах осуществления пациентов, страдающих MDS, можно лечить с использованием комбинации одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению и одного или нескольких дополнительных лекарственных средств для лечения MDS, включающих, например, талидомид, леналидомид, азацитадин, децитабин, эритропоэтины, дефероксамин, антитимоцитарный глобулин и филграстим (G-CSF).

Изначально отличаемый от апластической анемии, геморрагии или периферического гемолиза на основе феррокинетических исследований [см., например, Ricketts et al. (1978) *Clin Nucl Med* 3:159-164], неэффективный эритропоэз определяет разнообразную группу анемий, при которых продукция зрелых RBC является меньшей, чем можно было бы ожидать с учетом количества эритроидных предшественников (эритробластов), присутствующих в костном мозге [Tanno et al. (2010) *Adv Hematol* 2010:358283]. При таких анемиях гипоксия тканей сохраняется несмотря на повышенные уровни эритропоэтина вследствие неэффективной продукции зрелых RBC. В конечном итоге развивается замкнутый круг, в котором повышенные уровни эритропоэтина запускают массивную экспансию эритробластов, что потенциально приводит к спленомегалии (увеличение селезенки) вследствие внескелетномозгового эритропоэза [см., например, Aizawa et al. (2003) *Am J Hematol* 74:68-72], индуцируемой эритробластами патологии костей [см., например, Di Matteo et al. (2008) *J Biol Regul Homeost Agents* 22:211-216] и перегрузке тканей железом, даже в отсутствие терапевтических трансфузий RBC [см., например, Pippard et al. (1979) *Lancet*

2:819-821]. Таким образом, посредством усиления эффективности эритропоэза один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению может разорвать вышеупомянутый круг и, таким образом, смягчить не только исходную анемию, но также и ассоциированные с ней осложнения в виде повышенных уровней эритропоэтина, спленомегалии, патологии костей и перегрузки тканей железом. В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предупреждения неэффективного эритропоэза, включая анемию и повышенные уровни ЕРО, а также осложнения, такие как спленомегалия, индуцированная эритробластами патология костей, перегрузка железом и сопутствующие их патологии. В случае спленомегалии такие патологии включают боль в груди или животе и ретикулоэндотелиальную гиперплазию. Внекостномозговой гемопоэз может происходить не только в селезенке, но потенциально и других тканях в форме внекостномозговых гемопоэтических псевдоопухолей [см., например, Musallam et al. (2012) *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a013482]. Что касается индуцируемой эритробластами патологии костей, сопутствующие патологии включают низкую минеральную плотность костей, остеопороз и боль в костях [см., например, Haidar et al. (2011) *Bone* 48:425-432]. Что касается перегрузки железом, сопутствующие патологии включают супрессию гепцидина и избыточное всасывание железа, поступающего с пищей [см., например, Musallam et al. (2012) *Blood Rev* 26 (Suppl 1):S16-S19], множественные эндокринопатии и фиброз/цирроз печени [см., например, Galanello et al. (2010) *Orphanet J Rare Dis* 5:11] и обусловленную перегрузкой железом кардиомиопатию [Lekawanvijit et al., 2009, *Can J Cardiol* 25:213-218].

Наиболее частыми причинами неэффективного эритропоэза являются синдромы талассемии, наследственные гемоглобинопатии, при которых дисбаланс продукции интактных цепей альфа- и бета-гемоглобина приводит к повышению апоптоза в ходе созревания эритробластов [см., например, Schrier (2002) *Curr Opin Hematol* 9:123-126]. Талассемии в совокупности относятся к наиболее частым генетическим нарушениям по всему миру с изменением эпидемиологической картины, которые, согласно прогнозам, приведут к возрастающей проблеме здравоохранения в США и по всему миру [Vichinsky (2005) *Ann NY Acad Sci* 1054:18-24]. Синдромы талассемии называют по их тяжести. Таким образом, α -талассемии включают α -талассемию малую (также известную как α -thalassemia trait; два пораженных гена α -глобина), заболевание с гемоглобином H (три пораженных гена α -глобина) и α -талассемию большую (также известную как водянка плода; четыре пораженных гена α -глобина). β -талассемии включают β -талассемию малую (также известную как β -thalassemia trait; один пораженный ген β -глобина), β -талассемию промежуточную (два пораженных гена β -глобина), талассемию с гемоглобином E (два пораженных гена β -глобина) и β -талассемию большую (также известную как анемия Кули; два пораженных гена β -глобина, что приводит к полному отсутствию белка β -глобина). β -талассемия влияет на множество органов, ассоциирована со значительной заболеваемостью и смертностью и в настоящее время требует пожизненного лечения. Хотя продолжительность жизни у пациентов с β -талассемией возрастает в последние годы вследствие использования регулярных переливаний крови в комбинации с хелатированием железа, перегрузка железом вследствие как трансфузий, так и чрезмерного всасывания в желудочно-кишечном тракте, может вызвать серьезные осложнения, такие как заболевание сердца, тромбоз, гипонатризм, гипотиреоз, диабет, остеопороз и остеопения [см., например, Rund et al. (2005) *N Engl J Med* 353:1135-1146]. В определенных вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов белков рецепторов суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептора ЕРО, можно использовать для лечения или предупреждения синдрома талассемии.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептора ЕРО, можно использовать для лечения нарушений, обусловленных неэффективным эритропоэзом, помимо синдромов талассемии. Такие нарушения включают сидеробластную анемию (наследственную или приобретенную); дизэритропоэтическую анемию (типы I и II); серповидноклеточную анемию; наследственный сфероцитоз; дефицит пируваткиназы; мегалобластную анемию, потенциально вызванные состояниями, такими как дефицит фолатов (вследствие врожденных заболеваний, сниженного употребления или повышенной потребности), дефицит кобаламина (вследствие врожденных заболеваний, пернициозной анемии, нарушенного всасывания, недостаточности поджелудочной железы или сниженного употребления), определенные лекарственные средства или невыясненных причин (врожденная дизэритропоэтическая анемия, рефрактерная мегалобластная анемия или эритролейкоз); миелофтизная анемия, включая, например, миелофиброз (миелоидная метаплазия) и миелофтиз; врожденная эритропоэтическая порфирия и отравление свинцом.

В определенных вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать в комбинации с поддерживающей терапией от неэффективного эритропоэза. Такие способы терапии включают трансфузию либо эритроцитов, либо лейкоцитов, для лечения анемии. При хронических или наследственных анемиях нормальные механизмы гомеостаза железа перегружаются повторяющимися трансфузиями, что в конеч-

ном итоге приводит к токсичному и потенциально летальному накоплению железа в жизненно-важных тканях, таких как сердце, печень и эндокринные железы. Таким образом, поддерживающая терапия для пациентов, хронических страдающих неэффективным эритропоэзом, также включает лечение одной или несколькими хелатирующими железомолекулами для стимуляции экскреции железа с мочой и/или стулом и, тем самым, предупреждения или обращения вспять перегрузки тканей железом [см., например, Hershko (2006) *Haematologica* 91:1307-1312; Cao et al. (2011), *Pediatr Rep* 3(2):e17]. Эффективные хелатирующие железомолекулы должны быть способны селективно связывать и нейтрализовать трехвалентное железо, окисленную форму не связанного с трансферрином железа, которая, вероятно, обеспечивает основную часть токсичности железа вследствие каталитической продукции гидроксильных радикалов и продуктов окисления [см., например, Esposito et al. (2003) *Blood* 102:2670-2677]. Эти агенты являются структурно разнообразными, но все имеют донорные атомы кислорода или азота, способные образовывать нейтрализующие октаэдрические координационные комплексы с отдельными атомами железа в стехиометрии 1:1 (гексадентатные агенты), 2:1 (тридентатные) или 3:1 (бидентатные) [Kalinowski et al. (2005) *Pharmacol Rev* 57:547-583]. Как правило, эффективные хелатирующие железомолекулы также имеют относительно низкую молекулярную массу (например, менее 700 Да) с растворимостью как в воде, так и в липидах, чтобы иметь доступ к пораженным тканям. Конкретные примеры хелатирующих железомолекул включают дефероксамин, гексадентатный агент бактериального происхождения, требующих ежедневного парентерального введения, и перорально активные синтетические средства деферипрон (бидентатный) и деферасирокс (тридентатный). Комбинированная терапия, состоящая из введения в один и тот же день двух хелатирующих железомолекул является перспективной у пациентов, не отвечающих на хелатирующую монотерапию, а также для устранения проблем плохого соблюдения пациентами режима лечения, которым вводят только дефероксамин [Cao et al. (2011) *Pediatr Rep* 3(2):e17; Galanello et al. (2010) *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86].

Как используют в рамках изобретения, "в комбинации с" или "совместное введение" относится к любой форме введения, так чтобы вторая терапия все еще была эффективной в организме (например, два соединения являются одновременно эффективными у пациента, что может включать синергические эффекты двух соединений). Эффективность может не коррелировать с поддающейся измерению концентрацией средств в крови, сыворотке или плазме. Например, различные терапевтические соединения можно вводить либо в одном составе, либо в различных составах, либо одновременно, либо последовательно, и по различным схемам. Таким образом, для индивидуума, которому проводят такое лечение, может быть полезным комбинированный эффект различных способов терапии. Один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно вводить одновременно, до или после одного или нескольких других дополнительных средств или поддерживающих способов терапии. Как правило, каждое лекарственное средство вводят в дозе и/или по расписанию, определенным для этого конкретного средства. Для конкретной комбинации, используемой в режиме, будет учитываться совместимость антагониста по настоящему изобретению с терапией и/или желаемым терапевтическим эффектом, которого намереваются достигнуть.

В определенных вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать в комбинации с гепцидином или агонистом гепцидина против неэффективного эритропоэза. Циркулирующий полипептид, продуцируемый в основном печени, гепцидин считается основным регулятором метаболизма железа вследствие его способности индуцировать деградацию ферропортина, белка экспорта железа, локализованного на всасывающих энтероцитах, гепатоцитах и макрофагах. В общих чертах, гепцидин снижает доступность внеклеточного железа, таким образом, агонисты гепцидина могут быть полезными для лечения неэффективного эритропоэза [см., например, Nemeth (2010) *Adv Hematol* 2010:750643]. В поддержку этой точки зрения выступают полезные эффекты повышенной экспрессии гепцидина в модели β-талассемии на мышцах [Gardenghi et al. (2010) *J Clin Invest* 120:4466-4477].

Один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, необязательно в комбинации с активатором рецептора EPO, также могут быть пригодными для лечения анемий, обусловленных нарушенным созреванием RBC, которые частично характеризуются RBC уменьшенного размера (микроцитарные), увеличенного размера (макроцитарные), неправильной формы или аномального цвета (гипохромные).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения анемии у индивидуума, нуждающегося в этом, посредством введения индивидууму терапевтически эффективного количества одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению и активатора рецептора EPO. В определенных вариантах осуществления один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно использовать в комбинации с активаторами рецепторов EPO для снижения требуемой дозы этих активаторов у пациентов, подверженных неблагоприятным эффектам EPO. Эти способы можно использовать для терапевтического и профилактического лечения пациента.

Один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета

по изобретению можно использовать в комбинации с активаторами рецепторов EPO для достижения повышения уровня эритроцитов, в частности, при более низких диапазонах доз активаторов рецепторов EPO. Это может быть полезным для снижения известных неспецифических эффектов и рисков, ассоциированных с высокими дозами активаторов рецепторов EPO. Основные неблагоприятные эффекты включают EPO, например, чрезмерное повышение уровней гематокрита или гемоглобина и полицитемию. Повышенные уровни гематокрита могут приводить к гипертензии (более конкретно, к ухудшению гипертензии) и к тромбозу сосудов. Другими описанными неблагоприятными эффектами EPO, некоторые из которых связаны с гипертензией, являются головные боли, гриппоподобный синдром, обструкция шунтов, инфаркт миокарда и церебральные судороги вследствие тромбоза, гипертензивную энцефалопатию и аплазию эритроцитов. См., например, Singibarti (1994) *J. Clin Invest* 72(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) *Neurology* 49, 686-689; и Bunn (2002) *N Engl J Med* 346 (7), 522-523).

При условии, что гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета действуют посредством механизма, отличного от EPO, эти антагонисты могут быть пригодны для увеличения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов, которые плохо отвечают на EPO. Например, гетеромультимерный комплекс рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению может быть полезен для пациента, у которого введения от нормальной до увеличенной дозы EPO (>300 МЕ/кг/неделя) не приводит к повышению уровня гемоглобина до заданного уровня. Пациенты с недостаточным ответом на EPO встречаются при всех типах анемии, однако более высокое количество не отвечающих наблюдали, в частности, у пациентов со злокачественными опухолями и пациентами с заболеванием почек конечной стадии. Недостаточный ответ на EPO может быть либо постоянным (наблюдаемый при первом лечении EPO), либо приобретенным (наблюдаемый при повторно лечении EPO).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам управления течением у пациента, которого лечат или который является кандидатом для лечения одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, посредством количественного определения одного или нескольких гематологических параметров у пациента. Гематологические параметры можно использовать для оценки подходящего дозирования для пациента, который является кандидатом для лечения антагонистом по настоящему изобретению, для мониторинга гематологических параметров в ходе лечения, для оценки необходимости коррекции дозировки в ходе лечения одним или несколькими антагонистами по изобретению и/или для оценки подходящей поддерживающей дозы одного или нескольких антагонистов по изобретению. Если один или несколько гематологических параметров выходят за пределы нормального уровня, дозирование одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно снизить, отсрочить или завершить.

Гематологические параметры, которые можно измерять в соответствии со способами, описанными в настоящем описании, включают, например, уровни эритроцитов, кровяное давление, запасы железа и другие агенты в жидкостях организма, которые коррелируют с повышенными уровнями эритроцитов, с использованием известных в данной области способов. Такие параметры можно определять с использованием образца крови от пациента. Увеличение уровней эритроцитов, уровней гемоглобина и/или уровня гематокрита может вызвать повышение кровяного давления.

В одном варианте осуществления, если один или несколько гематологических параметров выходят за пределы нормального диапазона или находятся на верхней границе нормы у пациента, который является кандидатом для лечения одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, тогда начало введения одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению может быть отсрочено до тех пор, пока гематологические параметры не вернуться к норме или до приемлемого уровня либо естественным путем, либо посредством терапевтического вмешательства. Например, если пациент, являющийся кандидатом, имеет гипертензию или предгипертензию, тогда пациента можно лечить средством, снижающим кровяное давление, для снижения кровяного давления пациента. Можно использовать любое средство, снижающее кровяное давление, пригодное для состояния индивидуального пациента, включая, например, диуретики, адренергические ингибиторы (включая альфа-блокаторы и бета-блокаторы), сосудорасширяющие средства, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ACE) или блокаторы рецепторов ангиотензина II. Альтернативно, повышенное кровяное давление можно лечить с использованием режима диеты и физической нагрузки. Аналогично, если пациент, являющийся кандидатом, имеет запасы железа ниже нормы или на нижней границе нормы, тогда пациента можно лечить соответствующим режимом диеты и/или добавок железа до тех пор, пока запасы железа пациента не вернуться к норме или до приемлемого уровня. Для пациентов, имеющих уровни эритроцитов и/или уровни гемоглобина выше нормы, введение одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению может быть отсрочено до тех пор, пока уровни не вернуться к норме или до приемлемого уровня.

В определенных вариантах осуществления, если один или несколько гематологических параметров находятся вне нормального диапазона или на верхней границе нормы у пациента, который является кан-

дидатом для лечения одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков TGF-бета по изобретению, тогда начало введения может быть отсрочено. Однако дозировка и частота дозирования одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению могут быть выбраны так, чтобы снизить риск непереносимости повышения гематологических параметров в результате введения одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению. Альтернативно для пациента может быть разработан терапевтический режим, который сочетает в себе один или несколько гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению с лекарственным средством, которое направлено на нежелательный уровень гематологического параметра. Например, если пациент имеет повышенное кровяное давление, тогда может быть разработан терапевтический режим, вовлекающий введение одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению и средства, снижающего кровяное давление. Для пациента, имеющего запасы железа ниже желательного уровня, может быть разработан терапевтический режим из одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению и дополнения железа.

В одном варианте осуществления исходный параметр(ы) для одного или нескольких гематологических параметров может быть определен для пациента, который является кандидатом для лечения одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, и для этого пациента может быть разработан подходящий режим лечения на основе исходной величины(величин). Альтернативно определенные исходные параметры на основе анамнеза пациента можно использовать для разработки соответствующего режима дозирования для пациента. Например, если здоровый пациент имеет определенный исходный показатель кровяного давления выше установленного нормального диапазона, может быть необходимым приведение кровяного давления пациента в диапазон, который считается нормальным для общей популяции, перед лечением одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению. Исходные величины одного или нескольких гематологических параметров пациента перед лечением одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению также можно использовать в качестве соответствующих величин для сравнения в целях мониторинга каких-либо изменений гематологических параметров в ходе лечения одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению.

В определенных вариантах осуществления один или несколько гематологических параметров измеряют у пациентов, которых лечат одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению. Гематологические параметры можно использовать для мониторинга пациента в ходе лечения и возможности коррекции или завершения дозирования одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению или дополнительного дозирования другого лекарственного средства. Например, если введение одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению приводит к повышению кровяного давления, уровня эритроцитов или уровня гемоглобина или к снижению запасов железа, тогда количество или частота введения дозы одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению могут быть снижены для уменьшения эффектов одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению в отношении одного или нескольких гематологических параметров. Если введение одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению приводит к изменению одного или нескольких гематологических параметров, которые являются неблагоприятными для пациента, тогда дозирование одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно завершать, либо временно до тех пор, пока гематологических параметр(ы) не вернется к приемлемому уровню, либо навсегда. Аналогично, если один или несколько гематологических параметров не приходят в приемлемый диапазон после снижения дозы или частоты введения одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, тогда дозирование можно прекращать. В качестве альтернативы или дополнительно к снижению или завершению дозирования одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, пациенту можно вводить дополнительное лекарственное средство, которое направлено на нежелательный уровень гематологического параметра(ов), например, такое как средство, снижающее кровяное давление, или дополнение железа. Например, если пациент, которого лечат одним или несколькими гетеромультимерными комплексами рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению, имеет повышенное кровяное давление, тогда дозирование одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно продолжать на том же уровне, и к режиму добавлять средство, снижающее кровяное давление, дозирование одного или нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно снижать (например, количество и/или частоту) и к режиму лечения добавлять средство, снижающее кровяное давление, или дозирование одного или

нескольких гетеромультимерных комплексов рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по изобретению можно прекращать и пациента можно лечить средством, понижающим кровяное давление.

б. Фармацевтические композиции.

В некоторых аспектах гетеромультимерные комплексы рецепторов белков суперсемейства TGF-бета по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в качестве компонента фармацевтического состава (также называемого терапевтической композицией или фармацевтической композицией). Фармацевтический состав относится к препарату, имеющего такую форму, которая позволяет биологической активности активного ингредиента (например, средства по настоящему изобретению), содержащегося в ней, быть эффективной, и которая не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому состав намереваются вводить.

Рассматриваемые соединения можно составлять для введения любым удобным способом для применения в медицине человека или ветеринарии. Например, одно или несколько средств по настоящему изобретению могут быть составлены с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемый носитель относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который в основном является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается ими, буфер, эксципиент, стабилизатор и/или консервант. Как правило, фармацевтические составы для применения в рамках настоящего изобретения имеют свободную от пирогенов физиологически приемлемую форму при введении индивидууму. Терапевтически полезные средства, отличные от средств, описанных в настоящем описании, которые необязательно могут быть включены в состав, как описано выше, можно вводить в комбинации с рассматриваемыми средствами в способах по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления композиции вводят парентерально [например, посредством внутривенной (в/в) инъекции, внутриартериальной инъекции, внутрикостной инъекции, внутримышечной инъекции, интратекальной инъекции, подкожной инъекции или внутрикожной инъекции]. Фармацевтические композиции, пригодные для парентерального введения, могут содержать одно или несколько средств по изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или могут представлять собой стерильные порошки, которые могут быть восстановлены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением. Инъекционные растворы или дисперсии могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, суспендирующие вещества, загустители или растворимые вещества, которые сообщают составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических составах по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтилен гликоль и т.д.), растительные масла (например, оливковое масло), инъекционные органические сложные эфиры (например, этилолеат) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с использованием материалов покрытий (например, лецитин), посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с использованием поверхностно-активных веществ.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический способ по настоящему изобретению включает введение фармацевтической композиции системно или локально из имплантата или устройства.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть инкапсулирована или инъектирована в форме для доставки в область ткани-мишени (например, костный мозг или мышца). В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут включать матрикс, способный доставлять одно или несколько средств по настоящему изобретению в область ткани-мишени (например, костный мозг или мышца), предоставляющий структуру для развития ткани и в оптимальном случае способный быть резорбированным в организме. Например, матрикс может обеспечивать медленное высвобождение одного или нескольких средств по настоящему изобретению. Такие матриксы могут быть изготовлены из материалов, в настоящее время используемых для других медицинских применений имплантатов.

Выбор материала матрикса может быть основан на одном или нескольких из: биологической совместимости, способности к биодеградации, механических свойств, косметического внешнего вида и поверхностных свойств. Конкретное применение рассматриваемых композиций будет определять соответствующий состав. Потенциальные матриксы для композиций могут представлять собой способные к биодеградации и имеющими определенный химический состав сульфат кальция, трикальцийфосфат, гидроксипатит, полимолочную кислоту и полиангидриды. Другими потенциальными материалами являются способные к биодеградации и биологически определенные вещества, включая, например, кость или коллаген кожи. Следующие матриксы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие потенциальные матриксы не способны к биодеградации и имеют определенный химический состав, включая, например, спеченый гидроксипатит, биокерамику, оксиды алюминия или другие типы керамики. Матриксы могут состоять из комбинаций любых из вышеупомянутых типов материалов, включая, например, полимолочную кислоту и гидроксипатит или коллаген и трикальцийфосфат. Биокерамика может иметь изменяющийся состав (например, кальций-оксид алюминия-фосфат) и может быть

обработана для изменения одного или нескольких из размера пор, размера частиц, формы частиц и способности к биодеградации.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят местным путем. "Местное применение" или "местным путем" означает контакт фармацевтической композиции с поверхностями тела, включая, например, кожу, области раны и слизистые оболочки. Фармацевтические композиции для местного применения могут иметь различные формы и, как правило, содержат содержащий лекарственное средство слой, который приспособлен для помещения вблизи или в прямом контакте с тканью при местном введении композиции. Фармацевтические композиции, пригодные для местного введения, могут содержать один или несколько комплексов полипептидов рецепторов типа I и/или типа II белков суперсемейства TGF β по изобретению в комбинации, составленной в качестве жидкости, геля, крема, лосьона, мази, пены, пасты, мастики, полутвердого вещества или твердого вещества. Композиции в форме жидкости, геля, крема, лосьона, мази, пены, пасты или мастики можно наносить посредством распределения, распыления, размазывания, прикладывания или прокатывания композиции на ткани-мишени. Композициями также могут быть пропитаны стерильные повязки, трансдермальные пластыри, гипс и бинты. Композиции в форме мастики, полутвердого вещества или твердого вещества могут быть деформируемыми. Они могут быть эластичными или неэластичными (например, гибкие или жесткие). В некоторых аспектах композиция является частью композита и может включать волокна, частицы или множество слоев с одними и теми же или различными композициями.

Композиции для местного применения в жидкой форме могут включать фармацевтически приемлемые растворы, эмульсии, микроэмульсии и суспензии. В дополнение к активному ингредиенту(ам), жидкая дозированная форма может содержать инертный разбавитель, обычно используемый в данной области, включая, например, воду или другой растворитель, солюбилизатор и/или эмульгатор [например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль или 1,3-бутиленгликоль, масло (например, хлопковое масло, арахисовое, кукурузное, из зародышей кукурузы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоль, сложный эфир жирной кислоты и сорбитана и их смеси].

Местные композиции в форме геля, крема, лосьона, мази, полутвердого вещества или твердого вещества могут включать один или несколько загустителей, таких как полисахарид, синтетический полимер или полимер на основе белка. В одном варианте осуществления изобретения гелеобразующее вещество, описанное в настоящем описании, представляет собой гелеобразующее вещество, которые в подходящем случае является нетоксичным и обеспечивает желаемую вязкость. Загустители могут включать полимеры, сополимеры и мономеры следующих: винилпирролидоны, метакриламиды, акриламиды, N-винилимидазолы, карбоксивинилы, виниловый сложные эфиры, виниловые простые эфиры, силиконы, полиэтиленоксиды, полиэтиленгликолы, виниловые спирты, натрий акрилаты, акрилаты, малеиновая кислота, NN-диметилакриламиды, диацетонакриламиды, акриламиды, акрилоилморфолин, плюироник, коллагены, полиакриламиды, полиакрилаты, поливиниловые спирты, поливинилены, поливинилсилкаты, полиакрилаты, замещенные сахаром (например, сахароза, глюкоза, глюкозамины, галактоза, трегалоза, манноза или лактоза), ациламинопропан сульфоновые кислоты, тетраметоксиортосиликаты, метилтриметоксиортосиликаты, тетраалкоксиортосиликаты, триалкоксиортосиликаты, гликоли, пропиленгликоль, глицерин, полисахариды, альгинаты, декстраны, циклодекстрины, целлюлозы, модифицированные целлюлозы, окисленные целлюлозы, хитозаны, хитины, гуаровые камеди, каррагенаны, гиалуроновые кислоты, инулин, крахмалы, модифицированные крахмалы, агароза, метилцеллюлозы, растительные камеди, гиалуронаны, гидрогели, желатины, гликозаминогликаны, карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, пектины, пектины с низким уровнем метоксигрупп, сшитые декстраны, привитые сополимеры крахмал-акрилонитрил, крахмал натрий полиакрилат, гидроксипропилметакрилаты, гидроксилэтилакрилаты, поливинилден, полиэтилвиниловые простые эфиры, полиметилметакрилаты, полистиролы, полиуретаны, полиалканоаты, полимолочные кислоты, полилактаты, поли(3-гидроксибутират), сульфонируемые гидрогели, AMPS (2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновая кислота), SEM (сульфоэтилметакрилат), SPM (сульфопропилметакрилат), SPA (сульфопропилакрилат), N,N- диметил-N-метакрилоксиэтил-N-(3-сульфопропил)аммоний бетаин, метакриловая кислота амидопропил-диметиламмоний сульфобетаин, SPI (итаконовая кислота-бис(1-пропилсульфонизацид-3)сложный эфир соль дикалия), итаконовые кислоты, AMBC (3-акриламидо-3-метилбутановая кислота), бета-карбоксиэтилакрилат (димеры акриловой кислоты) и полимеры малеиновый ангидрид-метилвиниловый эфир, их производные, их соли, их кислоты и их комбинации. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально, например, в форме капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием вкусовой основы, такой как сахароза и гуммиарабик или трагакант), порошков, гранул, раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, жидкой эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", или эликсира или сироп, или пастилки (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или средств для полоскания полости рта, каждый из которых содержит заданное количество соединения по настоящему изобретению и необязательно один или несколько других активных ингредиентов. Соединение по настоящему изобретению и необязательно

один или несколько других активных ингредиентов также можно вводить в качестве болуса, электуария или пасты.

В твердых дозированных формах для перорального введения (например, капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки и гранулы), одно или несколько соединений по настоящему изобретению могут быть смешаны с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, включая, например, цитрат натрия, дикальций фосфат, наполнитель или разбавитель (например, крахмал, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота), связующее вещество (например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинат, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и гуммиарабик), увлажнитель (например, глицерин), разрыхлитель (например, агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, силикат и карбонат натрия), замедляющее растворение средство (например, парафин), средство, ускоряющее всасывание (например, четвертичное соединение аммония), смачивающее вещество (например, цетиловый спирт и глицеринмоностеарат), абсорбирующее вещество (например, каолин и бентонитовая глина), смазывающее вещество (например, тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия), краситель и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтический состав (композиция) также может содержать буферное вещество. Также в качестве наполнителей в мягких или твердых заполненных желатиновых капсулах можно использовать твердые композиции сходного типа с использованием одного или нескольких эксципиентов, включая, например, лактозу или молочный сахара, а также высокомолекулярный полиэтиленгликоль.

Жидкие дозированные формы для перорального введения фармацевтической композиции могут включать фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту(ам), жидкая дозированная форма может содержать инертный разбавитель, обычно используемый в данной области, включая, например, воду или другой растворитель, солюбилизатор и/или эмульгатор [например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль или 1,3-бутиленгликоль, масло (например, хлопковое, арахисовое, кукурузное, из зародышей кукурузы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоль, сложный эфир жирной кислоты и сорбитана и их смеси]. Помимо инертных разбавителей пероральный состав также может включать адъювант, включая, например, смачивающее вещество, эмульгатор и суспендирующее вещество, подсластитель, вкусовую добавку, краситель, отдушку, консервант и их комбинации.

Суспензии в дополнение к активным соединениям могут содержать суспендирующие вещества, включая, например, этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен сорбит, сложный эфир сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар, трагакант и их комбинации.

Предупреждение действия и/или роста микроорганизмов можно обеспечивать путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, включая, например, парабен, хлорбутанол и фенолсорбиновую кислоту.

В определенных вариантах осуществления может быть желательным включение обеспечивающего изотоничность средства, включая, например, сахар или хлорид натрия, в композиции. Кроме того, длительное всасывание инъекционной фармацевтической формы можно обеспечивать посредством включения средства, которое замедляет всасывание, включая, например, моностеарат алюминия и желатин.

Понятно, что режим дозирования будет определять лечащий врач с учетом различных факторов, которые модифицируют действие одного или нескольких средств по настоящему изобретению. В случае гетеромультимерного комплекса рецепторов белков суперсемейства TGF-бета, который стимулирует образование эритроцитов, различные факторы могут включать, но не ограничиваться ими, количество эритроцитов у пациента, уровень гемоглобина, желаемое заданное количество эритроцитов, возраст пациента, пол пациента, диету пациента, тяжесть какого-либо заболевания, которое может приводить к снижению уровня эритроцитов, время введения и другие клинические факторы. Также на дозировку может влиять добавление других известных активных веществ в конечную композицию. Мониторинг прогресса можно проводить посредством периодической оценки одного или нескольких из уровней эритроцитов, уровней гемоглобина, уровней ретикулоцитов и других индикаторов гемопоза.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к генной терапии для продукции *in vivo* одного или нескольких средств по настоящему изобретению. Такая терапия может достигать ее терапевтического эффекта посредством введения последовательностей средств в клетки или ткани, имеющие одно или несколько нарушений, приведенных выше. Доставку последовательностей средств можно осуществлять, например, с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, такого как химерный вирус или коллоидная дисперсная система. Предпочтительной терапевтической доставкой одной или нескольких последовательностей средств по изобретению является использование направленных липосом.

Различные вирусные векторы, которые можно использовать для генной терапии, как описано в настоящем описании, включают аденовирус, вирус герпеса, вирус осповакцины или РНК-вирус (например, ретровирус). Ретровирусный вектор может представлять собой производное ретровируса мышей или птиц. Примеры ретровирусных векторов, в которые может быть встроен один чужеродный ген, включа-

ют, но не ограничиваются ими: вирус лейкоза мышей Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочных желез мышей (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов может включать несколько генов. Все из этих векторов могут переносить или включать ген селективного маркера, чтобы трансдуцированные клетки можно было идентифицировать и получить. Ретровирусные векторы можно сделать специфичными к мишени посредством присоединения, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание проводят с использованием антитела. Специалистам в данной области будет понятно, что конкретные полинуклеотидные последовательности можно встраивать в ретровирусный геном или связывать с оболочкой вируса, чтобы обеспечить специфичную к мишени доставку ретровирусного вектора, содержащего одно или несколько средств по настоящему изобретению.

Альтернативно, клетки для культивирования тканей можно прямо трансфицировать плазмидами, кодирующими ретровирусные структурные гены (*gag*, *pol* и *env*), посредством общепринятой трансфекции с фосфатом кальция. Затем эти клетки трансфицируют векторной плазмидой, содержащей представляющие интерес гены. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другой системой направленной доставки для одного или нескольких средств по настоящему изобретению является коллоидная дисперсная система. Коллоидные дисперсные системы включают, например, макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии типа "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. В определенных вариантах осуществления предпочтительной коллоидной системой по настоящему изобретению является липосома. Липосомы представляют собой искусственные мембранные везикулы, которые пригодны в качестве носителей для доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы могут быть инкапсулированы в водную внутреннюю среду и могут быть доставлены к клеткам в биологически активной форме. См., например, Fraley, et al. (1981) *Trends Biochem. Sci.*, 6:77. Способы эффективного переноса генов с использованием липосомального носителя известны в данной области. См., например, Mannino, et al. (1988) *Biotechniques*, 6:682, 1988.

Композиция липосомы обычно представляет собой комбинацию фосфолипидов, которые могут включать стероид (например, холестерин). Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов. Также можно использовать другие фосфолипиды или другие липиды, включая, например, фосфатидильное соединение (например, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, сфинголипид, цереброзид и ганглиозид), яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Нацеливание липосом также является возможным, например, на основе специфичности к органу, клеточной специфичности и специфичности к органелле, и оно известно в данной области.

Примеры

После общего описания изобретения оно станет более понятным с помощью следующих примеров, которые включены только для целей иллюстрации определенных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

Пример 1. Получение гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс ActRIIB-Fc:ALK4-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIB человека и ALK4 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид ActRIIB-Fc и слитый полипептид ALK4-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них представлены ниже.

Методология обеспечения образования гетеромерных комплексов ActRIIB-Fc:ALK4-Fc в противоположность гомодимерным комплексам ActRIIB-Fc или ALK4-Fc, состоит во внесении изменений в аминокислотную последовательность Fc-доменов для способствования образованию асимметричных гетеромерных комплексов. В настоящем описании описано много различных подходов для получения асимметричных взаимодействующих пар с использованием Fc-доменов.

В одном подходе, проиллюстрированном на полипептидных последовательностях ActRIIB-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 100-102 и 104-106, соответственно, один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия. В каждом из слитого полипептида ActRIIB-Fc и слитого полипептида ALK4-Fc используется лидерная последовательность тканевого активатора плазминогена (TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 98).

Последовательность полипептида ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 100) представлена ниже:

1 MDAMKRG~~LCC~~ 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: 100)

Лидерная (сигнальная) последовательность и линкер подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc, но не любого из возможных гетеродимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка ActRIIB может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты на лизин), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 100 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина (K) на C-конце.

Этот слитый белок ActRIIB-Fc кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 101):

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 CTCCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 401 CACCCCGGAC AGCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 651 CAACAGCAGC TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCTT STATAGCAAG CTCACCGTGG
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
 1101 TAAA (SEQ ID NO: 101)

Зрелый слитый полипептид ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 102) является следующим, и он необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на C-конце.

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSLERC 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 QPENNYKTT PPVLKSDGSF
 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK
 (SEQ ID NO: 102)

Комплементарная форма слитого полипептида ALK4-Fc (SEQ ID NO: 104) является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
 51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSSED LRNTHCCYTD
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQOPENNY
 301 DTTFPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPG (SEQ ID NO: 104)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 100 и 102, выше в Fc-домен слитого полипептида ALK4-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 104 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ALK4-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 105):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGTTC CAGGCTCTGC
 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
 151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
 251 ACTGCCTGAG CTGGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAACTCACA
 401 CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
 451 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
 501 GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCCT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
 701 ACAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAGGG
 751 CAGCCCCGAG AACACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT
 801 GACCAAGAAC CAGGTACGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACAC
 901 GACACCACGC CTCCCGTCTG GACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
 951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
 1051 TCCCTGTCTC CGGGT (SEQ ID NO: 105)

Зрелая последовательность слитого белка ALK4-Fc (SEQ ID NO: 106) является следующей и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

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 QPENNYDTP PVLDSDGSFF LYSDLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 106)

Белки ActRIIB-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 106, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK4-Fc.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как проиллюстрировано в последовательностях полипептидов ActRIIB-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 401-402 и 403-404 соответственно. В каждом из слитого полипептида ActRIIB-Fc и слитого полипептида ALK4-Fc может использоваться лидерная последовательность тканевого активатора плазминогена (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 98).

Последовательность полипептида ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 401) показана ниже:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQ
 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 KNQVSLCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 401)

Лидерная (сигнальная) последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc, а не любого из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 401 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Зрелый слитый полипептид ActRIIB-Fc является следующим:

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
 251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDSGSF
 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLS PGK
 (SEQ ID NO: 402)

Комплементарная форма слитого полипептида ALK4-Fc (SEQ ID NO: 403) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
 51 GACMVSIFNL DGMENHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPKPKKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 301 KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPGK (SEQ ID NO: 403)

Лидерная последовательность и линкер подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401 и 402 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK4 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 403 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK4-Fc является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

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 QPENNYKTT PVLDSGDSFF LVSKLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKLSLSLSP GK (SEQ ID NO: 404)

Белки ActRIIB-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 402 и SEQ ID NO: 404, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK4-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIB-Fc:ALK4-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзивная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 2. Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK4-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом ActRIIB-Fc:ALK4-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами ActRIIB-Fc и ALK4-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK4-Fc независимо улавливали на системе с использованием анти-тела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Скорость диссоциации лиганда является особенно значительным параметром для оценки ловушек лигандов. Растворимые белки рецептор-Fc, введенные *in vivo* постоянно конкурируют с нативными рецепторами для лигандов. Когда эндогенные лиганды суперсемейства TGF-бета обычно связываются со своими рецепторами на клеточной поверхности, запускается многостадийный процесс передачи сигнала, который является относительно медленным по молекулярной шкале времени. Нативные рецепторы диссоциируют от лиганда медленно, частично потому, что значительное количество времени требуется для генерирования внутриклеточного сигнала в результате события связывания лиганда. Чтобы растворимый белок рецептор-Fc эффективно конкурировал за лиганд, скорость диссоциации его комплекса с лигандом должна быть сходной или более медленной, чем скорость диссоциации комплекса лиганда с нативным рецептором. Связывание лиганда является динамическим процессом, и некоторая часть лиганда всегда находится в несвязанной форме, таким образом, терапевтически является важным для дозы белка рецептор-Fc улавливать лиганд-мишень настолько надолго, насколько это возможно. Одним способом смещения равновесия в сторону большего количества уловленного лиганда является повышение концентрации (дозировки) ингибитора, однако это может привести к неспецифическим эффектам, которые снижают переносимость и безопасность. Предпочтительным подходом является использование ингибитора с более низкой скоростью диссоциации лиганда (более длительным временем улавливания) в комбинации с селективностью связывания лиганда для достижения эффективного уровня антагонизма лиганду при более низкой концентрации ингибитора.

Профиль связывания лиганда гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK4-Fc									
Лиганд	Гомодимер ActRIIB-Fc			Гомодимер ALK4-Fc			Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc		
	K_a (1/M с)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/M с)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/M с)	K_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	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
Активин В	5,1×10 ⁶	1,0×10 ⁻⁴	20	Нет связывания			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	---			Временное*		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

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия
† Очень низкий сигнал
--- Не тестировали

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc имеет измененный профиль/селективность связывания относительно либо гомодимера ActRIIB-Fc, либо гомодимера ALK4-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc демонстрирует усиленное связывание с активин В по сравнению с каким-либо из гомодимеров, сохраняет прочное связывание с активин А, GDF8 и GDF11, как наблюдали для гомодимера ActRIIB-Fc, и демонстрирует существенно сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3. В частности, BMP9 демонстрирует низкую или не демонстрирует поддающейся обнаружению аффинности в отношении гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc, в то время как этот

лиганд прочно связывается с гомодимером ActRIIB-Fc. Подобно гомодимеру ActRIIB-Fc, гетеродимер сохраняет промежуточный уровень связывания с BMP6. См. фиг. 6.

Таким образом, эти результаты демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc является более селективным антагонистом активина А, активина В, GDF8 и GDF11 по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc. Следовательно, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc будет более полезным, чем гомодимер ActRIIB-Fc в определенных применениях, где такой селективный антагонизм является преимущественным. Примеры включают терапевтические применения, где желательно сохранить антагонизм одному или нескольким из активина А, активина В, активина АС, GDF8 и GDF11, но минимизировать антагонизм одному или нескольким из BMP9, BMP10 и BMP6.

Пример 3. Профиль активности гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc у мышей по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc.

Гомодимерные и гетеродимерные комплексы исследовали у мышей для изучения отличий их профилей активности *in vivo*. Мышам C57BL/6 дикого типа вводили подкожно гомодимер ActRIIB-Fc (10 мг/кг), гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc (3 или 10 мг/кг) или носитель (фосфатно-солевой буфер, PBS) два раза в неделю в течение 4 недель, начиная с возраста приблизительно 10 недель (n=9 мышей на группу). Гомодимер ALK4-Fc не исследовали *in vivo* вследствие его неспособности связывать лиганды с высокой аффинностью в бесклеточных условиях, определенной с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Конечные результаты исследования включали: массу тела; общую безжировую массу и общую массу жировой ткани при определении посредством ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на исходном уровне и при завершении исследования (4 недели); общую минеральную плотность кости при определении посредством двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на исходном уровне и через 4 недели, и массу икроножной, прямой бедренной и грудной мышц, определенную через 4 недели.

Активность комплексов ActRIIB-Fc и ALK4-Fc у мышей дикого типа				
Конечный результат (4 недели)	Носитель	Гомодимер ActRIIB-Fc, 10 мг/кг	Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc	
			10 мг/кг	3 мг/кг
Изменение массы тела от исходного уровня	↑ 15%	↑ 38% **	↑ 41% **	↑ 33% **
Изменение общей безжировой массы тела от исходного уровня	↓ 1%	↑ 5% **	↑ 5% **	↑ 5% **
Изменение общей массы жировой ткани от исходного уровня	↑ 5%	↓ 36% **	↓ 35% **	↓ 35% **
Изменение общей минеральной плотности костей от исходного уровня	↑ 8%	↑ 14% *	↑ 12% *	↑ 11%
Масса икроножной мышцы †	23	36 **	35 **	30 **
Масса бедренной мышцы †	11,5	17 **	16 **	14 **
Масса грудной мышцы †	15	23 **	28 **	23 **
*P < 0,05 против носителя **P < 0,01 против носителя † Объединенная масса левой и правой мышц, нормализованная к длине бедра (мг/мм) для учета размера тела				

Результаты исследования обобщенно представлены в таблице выше. Как и ожидалось, гомодимер ActRIIB-Fc вызывал выраженные изменения состава тела, многие из которых согласуются с известными эффектами ингибирования GDF8 и активина. Введение мышам дикого типа гомодимера ActRIIB-Fc более чем удваивало увеличение массы тела в ходе исследования по сравнению с контролями, которым вводили носитель. Это суммарное увеличение массы сопровождалось значительным увеличением общей безжировой массы и общей минеральной плотности костей, а также значительным снижением общей массы жировой ткани, по сравнению с носителем. Должно быть понятно, что нормализованные (на основе процентов) изменения безжировой массы и массы жировой ткани отличаются их соответствием абсолютным изменениям, поскольку безжировая масса (как правило, приблизительно 70% массы тела у мыши) значительно больше, чем масса жировой ткани (как правило, приблизительно 10% массы тела). Масса всех исследованных отдельных скелетных мышц, включая икроножную, бедренную и грудную, значительно возрастала по сравнению с контролями в виде носителей в ходе введения гомодимера ActRIIB-Fc.

Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc обеспечивал определенные эффекты, поразительно сходные с эффектами гомодимера ActRIIB-Fc, несмотря на дифференциальную селективность этих двух комплексов в отношении лигандов. Как показано в таблице выше, введение мышам гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc на уровне дозы 10 мг/кг совпадало, практически совпадало или превышало эффекты гомодимера ActRIIB-Fc при том же уровне дозы для всех приведенных конечных результатов. Эффекты гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK4-Fc в дозе 3 мг/кг были немного более слабыми для некоторых конечных результатов по сравнению с 10 мг/кг, таким образом, подтверждая взаимосвязь доза-эффект.

Таким образом, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc демонстрирует благоприятные анаболические эффекты на скелетные мышцы и кости и катаболические эффекты на жировую ткань, в высокой степени сходные с эффектами гомодимера ActRIIB-Fc. Однако в отличие от гомодимера ActRIIB, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK4-Fc демонстрирует только низкую аффинность или временное связывание с BMP9 и BMP10 и, таким образом, он не ингибирует одновременно процессы, опосредуемые этими лигандами, такие как ангиогенез. Эта новая селективность может быть полезной, например, при лечении пациентов, нуждающихся в стимулирующих эффектах на мышцы и кости и ингибиторных эффектах на жировую ткань, но не нуждающихся в изменении ангиогенеза.

Пример 4. Получение гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK3-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс ActRIIB-Fc:ALK3-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIB человека и ALK3 человека, каждый из которых был слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIB-Fc и ALK3-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIB-Fc:ALK3-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 100-102.

В комплементарном слитом белке ALK3-Fc используется лидерная последовательность ТРА, и он является следующим:

```

1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGAQNLD SM LHGTGMKSDS DQKSENGVT
51 LAPEDTL PFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCFAIIEED DQGETTLASG
101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGFFFDG
151 SIRTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
201 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
251 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
301 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSGDSFF LYSDLTVDKS
351 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 115)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK3-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 115 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитый белок ALK3-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 116).

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCCAGAATCT GGATAGTATG CTTTCATGGCA
 101 CTGGGATGAA ATCAGACTCC GACCAGAAAA AGTCAGAAAA TGGAGTAACC
 151 TTAGCACCAG AGGATACCTT GCCTTTTTTA AAGTGCTATT GCTCAGGGCA
 201 CTGTCCAGAT GATGCTATTA ATAACACATG CATAACTAAT GGACATTGCT
 251 TTGCCATCAT AGAAGAAGAT GACCAGGGAG AAACCACATT AGCTTCAGGG
 301 TGTATGAAAT ATGAAGGATC TGATTTTCAG TGCAAAGATT CTCCAAAAGC
 351 CCAGCTACGC CGGACAATAG AATGTTGTCG GACCAATTTA TGTAAACCAGT
 401 ATTTGCAACC CACTGCCCC CCTGTTGTCA TAGGTCCGTT TTTTGATGGC
 451 AGCATTCGAA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCACCCGT GCCCAGCACC
 501 TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCSCCCCA AAACCCAAAGG
 551 ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
 601 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT
 651 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA
 701 CGTACCGTGT GGTACAGGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT
 751 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT
 801 CGAGAAAACC ATCTCCAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT
 851 ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTACGCTG
 901 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
 951 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACGA CACCACGCCT CCCGTGCTGG
 1001 ACTCCGACGG TCCTTCTTC CTCTATAGCG ACCTACCGT GGACAAGAGC
 1051 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
 1101 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGT
 (SEQ ID NO: 116)

Последовательность зрелого слитого белка ALK3-Fc является следующей (SEQ ID NO: 117) и обязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

1 GAQNLDMLH GTGKSDSDQ KSENGVTLA PEDTLPLK YCSGHCPDDA
 51 INNTCITNGH CFAIIEEDDQ GETTLASGCM KYEGSDFQCK DSPKAQLRRT
 101 IECRTNLN QYLQPTLPPV VIGPFDGSI RTGGGHTTCP PCPAPELLGG
 151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
 201 KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
 251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLT LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
 301 ENNYDTPPV LKSDGSFFLY SLDLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
 351 QKSLSLSPG (SEQ ID NO: 117)

Слитые белки ActRIIB-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 117, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK3-Fc.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, проиллюстрированных в последовательностях полипептидов ActRIIB-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 401-402 и 407-408, соответственно, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида ActRIIB-Fc рассмотрены в примере 1.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK3-Fc (SEQ ID NO: 407) является следующей:

1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGAQNLD SM LHGTGKSDS DQKSENGVT
 51 LAPEDTLPLF KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCFIIEED DQGETTLASG
 101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PTVIGPFDG
 151 SIRTGGGHT CFPPEPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 201 VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 251 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPSPR EEMTKNQVSL
 301 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLSDGSFF LVSKLTVDKS
 351 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 407)

Лидерная последовательность и линкер подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401 и 402 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK3 можно вносить четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 407 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK3-Fc (SEQ ID NO: 408) является следующей и не-

обязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина (K) на С-конце.

```

1 GAQNLDSMLH GTGMKSDSDQ KKSENGVTLA PEDTLPFLKC YCSGHCPDDA
51 INNTCITNGH CFAIIEEDDQ GETTLASGCM KYEGSDFQCK DSPKAQLRRT
101 IEC CRTNLCN QYLQPTLPPV VIGPFFD GSI RTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VCTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 408)

```

Белки ActRIIB-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 402 и SEQ ID NO: 408, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK3-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIB-Fc:ALK3-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 5. Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK3-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK3-Fc.

Анализ связывания на основе Viacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом ActRIIB-Fc:ALK3-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами ActRIIB-Fc и ALK3-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK3-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK3-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK3-Fc			
Лиганд	Гомодимер ActRIIB-Fc	Гомодимер ALK3-Fc	Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc

	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	1,3×10 ⁷	1,4×10 ⁻⁴	11	Нет связывания			3,4×10 ⁷	5,0×10 ⁻³	150
Активин В	5,1×10 ⁶	1,0×10 ⁻⁴	20	Нет связывания			2,8×10 ⁶	5,7×10 ⁻⁴	200
BMP2	Transient*		> 66000	6,8×10 ⁵	8,9×10 ⁻⁵	130	8,0×10 ⁶	1,1×10 ⁻⁵	1
BMP4	---			3,0×10 ⁵	5,3×10 ⁻⁵	180	2,6×10 ⁶	6,5×10 ⁻⁶	3
BMP5	2,6×10 ⁷	7,5×10 ⁻²	2900	2,9×10 ⁴	2,0×10 ⁻³	7000 0	9,0×10 ⁵	5,8×10 ⁻⁴	640
BMP6	3,5×10 ⁷	6,8×10 ⁻³	190	1,4×10 ⁵	4,9×10 ⁻³	3500 0	2,0×10 ⁷	2,9×10 ⁻⁴	15
BMP7	8,8×10 ⁶	1,4×10 ⁻²	1600	1,2×10 ⁶	1,8×10 ⁻²	1500 0	8,2×10 ⁵	1,5×10 ⁻³	1900
BMP9	3,9×10 ⁷	1,3×10 ⁻³	34	Нет связывания			Временное*		>3300 0
BMP10	5,9×10 ⁷	2,0×10 ⁻⁴	4	Нет связывания			3,0×10 ⁷	9,4×10 ⁻⁴	31
GDF3	1,6×10 ⁶	2,3×10 ⁻³	1400	Нет связывания			1,4×10 ⁷	8,2×10 ⁻²	5900
GDF5	Временное*		> 9600	4,8×10 ⁵	1,1×10 ⁻²	2200 0	1,2×10 ⁷	8,3×10 ⁻⁴	70
GDF6	---			3,4×10 ⁴	1,3×10 ⁻³	4000 0	2,8×10 ⁵	4,5×10 ⁻⁴	1600
GDF7	Временное*		> 12000	2,2×10 ⁵	2,7×10 ⁻²	1200 0	7,5×10 ⁶	4,0×10 ⁻⁴	52
GDF8	8,3×10 ⁵	2,3×10 ⁻⁴	280	Нет связывания			3,0×10 ⁶	9,2×10 ⁻⁴	310
GDF11	5,0×10 ⁷	1,1×10 ⁻⁴	2	Нет связывания			1,6×10 ⁷	1,1×10 ⁻³	66
* Не определено вследствие временной природы взаимодействия									
--- Не тестировали									

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc имеет измененный профиль/селективность связывания относительно как гомодимера ActRIIB-Fc, так и гомодимера ALK3-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc связывает BMP2 и BMP4 с исключительно высокой аффинностью и демонстрирует значительно усиленное связывание с BMP5, BMP6, BMP7, GDF5, GDF6 и GDF7 по сравнению с каким-либо гомодимером. По сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc демонстрирует сниженное связывание с активинном А, активинном В, BMP10, GDF8 и GDF11, а также различает эти лиганды в большей степени, в частности активин А и активин В. Кроме того, способность гомодимера ActRIIB-Fc связывать BMP9 и GDF3 с высокой аффинностью у гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK3-Fc отсутствует. См. фиг. 7.

Таким образом, эти результаты демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc является селективным ингибитором активина В, лиганда подсемейства GDF5/GDF6/GDF7 и нескольких ключевых лигандов BMP, наиболее примечательно, за исключением BMP9. Следовательно, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc является более пригодным, чем либо гомодимер ActRIIB-Fc, либо гомодимер ActRIIB-Fc в определенных применениях, где такой селективный антагонизм является преимущественным. Примеры включают терапевтические применения, где желательно сохранить антагонизм BMP2, BMP4, BMP5 и BMP6 или активину В, но минимизировать антагонизм одному или нескольким лигандам с анаболическими эффектами на мышцы (например, активин А и GDF8) или лигандам с ангиогенными эффектами (например, BMP9 и BMP10).

Пример 6. Профиль активности гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK3-Fc у мышей по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK3-Fc.

Гомодимерные и гетеродимерные комплексы исследовали у мышей для изучения отличий их про-

филей активности *in vivo*. Мышам C57BL/6 дикого типа вводили подкожно гомодимер ActRIIB-Fc (10 мг/кг), гомодимер ALK3-Fc (10 мг/кг), ActRIIB-Fc:ALK4-Fc гетеродимер (3 или 10 мг/кг) или носитель (фосфатно-солевой буфер, PBS) два раза в неделю в течение 6,5 недель (46 суток), начиная с возраста 10 недель (n=5 мышей на группу). Конечные результаты исследования включали массу тела, общую массу жировой ткани при определении посредством ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на исходном уровне и при завершении исследования (6,5 недель); общую минеральную плотность кости при определении посредством двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на исходном уровне и через 6,5 недель.

Активность комплексов ActRIIB-Fc и ALK3-Fc у мышей дикого типа по сравнению с носителем				
Конечный результат через 6,5 недели	Гомодимер ActRIIB-Fc, 10 мг/кг	Гомодимер ALK3-Fc, 10 мг/кг	Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc	
			10 мг/кг	3 мг/кг
Масса тела	↑ 23% *	↓ 3%	↓ 0,5%	↓ 1%
Общая масса жировой ткани	↓ 41% *	↓ 12%	↓ 14% *	↓ 18% *
Общая минеральная плотность костей	↑ 8% *	↑ 6% *	↑ 9% *	↑ 10% *

* P < 0,05 против носителя

Результаты исследования обобщено представлены в таблице выше. Как и ожидалось, гомодимер ActRIIB-Fc значительно увеличивал массу тела и общую минеральную плотность костей и значительно снижал общую массу жировой ткани, во всех случаях по сравнению с носителем. Также, как и ожидалось, гомодимер ALK3-Fc значительно повышал общую минеральную плотность костей по сравнению с носителем, но в отличие от гомодимера ActRIIB-Fc не изменял значительно ни массу тела, ни общую массу жировой ткани. Примечательно, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc демонстрировал профиль активности, отличный как от гомодимера ActRIIB-Fc, так и от гомодимера ALK3-Fc. Введение мышам гетеродимера ActRIIB-Fc :ALK4-Fc на любом уровне дозы значительно повышало минеральную плотность костей по меньшей мере также, как введение любого гомодимера. Однако, в отличие от гомодимера ALK3-Fc, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc значительно снижал массу жировой ткани, и в отличие от гомодимера ActRIIB-Fc гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc значительно снижал массу жировой ткани без изменения массы тела. Таким образом, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK3-Fc демонстрирует благоприятные эффекты на кость вместе с потенциально благоприятными эффектами на жировую ткань. Эта новая селективность является полезной, например, при лечении пациентов, нуждающихся в стимулирующих эффектах на кость и ингибиторных эффектах на жировую ткань, но не нуждающихся в изменении массы тела.

Пример 7. Получение гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK7-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс ActRIIB-Fc:ALK7-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIB человека и ALK7 человека, каждый из которых был слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIB-Fc и ALK7-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK7-Fc:ActRIIB-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 100-102.

В комплементарной слитом белке ALK7-Fc используется лидерная последовательность ТРА, и он является следующим (SEQ ID NO: 112):

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAGLKVC LLCSSNFTC QTEGACWASV
 51 MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
 101 TASPNAKLG PMETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR
 251 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTP PVLDSDGSFF
 301 LYSDLTVDKS RWQQGNVFS SVMHEALHNH YTKSLSLSP G
 (SEQ ID NO: 112)

Сигнальная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK7-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 112 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ALK7-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 113):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGCG CCGGACTGAA GTGTGTATGT CTTTGTGTG
 101 ATTCTTCAAA CTTTACCTGC CAAACAGAAG GAGCATGTTG GGCATCAGTC
 151 ATGCTAACCA ATGGAAAAGA GCAGGTGATC AAATCCTGTG TCTCCCTCC
 201 AGAACTGAAT GCTCAAGTCT TCTGTATAG TTCCAACAAT GTTACCAAAA
 251 CCGAATGCTG CTTTACAGAT TTTTGCAACA ACATAACACT GCACCTTCCA
 301 ACAGCATCAC CAAATGCCCC AAAACTTGGG CCCATGGAGA CCGGTGGTGG
 351 AACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGACCGT
 401 CAGTCTTCTT CTTCCCCCA AAACCAAGG ACACCTCAT GATCTCCCGG
 451 ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCTGA
 501 GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA
 551 CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC
 601 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTCAA
 651 GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG
 701 CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGG
 751 GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT
 801 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA
 851 ACAACTACGA CACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCTTCTTC
 901 CTCTATAGCG ACCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT
 951 CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA
 1001 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGT (SEQ ID NO: 113)

Ожидается, что зрелая последовательность слитого белка ALK7-Fc (SEQ ID NO: 114) будет слитой и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

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 AIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 251 EWESNGQPEN NYDTPPVLD SDGSFFLYSD LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 301 EALHNHYTQK SLSLSPG (SEQ ID NO: 114)

Слитые белки ActRIIB-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 114, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK7-Fc.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, проиллюстрированных в последовательностях полипептидов ActRIIB-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 401-402 и 405-406, соответственно, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида ActRIIB-Fc рассмотрены в примере 1.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK7-Fc (SEQ ID NO: 405) является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAGLKVCV LLCSSNFTC QTEGACWASV
 51 MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
 101 TASPNAPKLG PMETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF N^WYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVCTLPPSR
 251 EEMTKNQVSL SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDGFF
 301 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
 (SEQ ID NO: 405)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401 и 402 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK7 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Более того, С-концевой остаток лизин Fc-домена может быть удален. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 405 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Ожидается, что последовательность зрелого слитого белка ALK7-Fc (SEQ ID NO: 406) будет следующей, и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 GLKCVCLLCD SSNFTCQTEG ACWASVMLTN GKEQVIKSCV SLPELNAQVF
 51 CHSSNNVTKT ECCFTDFCNN ITLHLPTASP NAPKLGPMET GGGTHTCPPC
 101 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKENWYV
 151 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 201 APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSREEMT KNQVLSCAV KGFYPSDIAV
 251 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 301 EALHNNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 406)

Белки ActRIIB-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 402 и SEQ ID NO: 406, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK7-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIB-Fc:ALK7-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 8. Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK7-Fc.

Анализ на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом ActRIIB-Fc:ALK7-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами ActRIIB-Fc и ALK7-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK7-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK7-Fc									
Лиганд	Гомодимер ActRIIB-Fc			Гомодимер ALK7-Fc			Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7-Fc		
	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	$1,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^{-4}$	11	Нет связывания			$4,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^{-3}$	43
Активин В	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{-4}$	8	Нет связывания			$1,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^{-4}$	17
BMP5	$2,6 \times 10^7$	$7,5 \times 10^{-2}$	2900	Нет связывания			$1,5 \times 10^5$	$8,5 \times 10^{-3}$	57000
BMP6	$2,4 \times 10^7$	$3,9 \times 10^{-3}$	160	Нет связывания			$1,2 \times 10^6$	$6,3 \times 10^{-3}$	5300
BMP9	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{-3}$	10	Нет связывания			Временное*		>1400
BMP10	$5,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-4}$	25	Нет связывания			$1,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^{-3}$	190
GDF3	$1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	1500	Нет связывания			$2,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-2}$	4500
GDF8	$3,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-4}$	69	Нет связывания			$3,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-3}$	270
GDF11	$9,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^{-4}$	2	Нет связывания			$9,5 \times 10^7$	$7,5 \times 10^{-4}$	8

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7-Fc имеет отличающийся профиль связывания как от гомодимера ActRIIB-Fc, так и от гомодимера ALK7-Fc. Интересно, что четыре из пяти лигандов с прочным связыванием с гомодимером ActRIIB-Fc (активин А, BMP10, GDF8 и GDF11) демонстрируют сниженное связывание с гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc, за исключением активина В, который сохраняет прочное связывание с гетеродимером. Кроме того, три лиганда с промежуточным связыванием с гомодимером ActRIIB-Fc (GDF3, BMP6 и особенно BMP9) демонстрируют сниженное связывание с гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc. Напротив, BMP5 связывает гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7 с промежуточной прочностью, несмотря на только слабое связывание с гомодимером ActRIIB-Fc. Исследованные лиганды не связывали гомодимер ActRIIB-Fc. См. фиг. 8.

Таким образом, эти результаты демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7-Fc является более селективным антагонистом активина В по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc. Следовательно, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK7-Fc будет более полезным, чем гомодимер ActRIIB-Fc, в определенных применениях, где такой селективный антагонизм является преимущественным. Примеры включают терапевтические применения, где желательно сохранить антагонизм активину В, но минимизировать антагонизм одному или нескольким из активина А, GDF3, GDF8, GDF11, BMP9 или BMP10.

Пример 9. Получение гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK2-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс ActRIIB-Fc:ALK2-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIB человека и ALK2 человека, каждый из которых был слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIB-Fc и ALK2-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIB-Fc:ALK2-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 100-102.

В комплементарном слитом белке ALK2-Fc используется лидерная последовательность ТРА, и он является следующим (SEQ ID NO: 136):

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAMEDKPK KVNPKLYMCV CEGLSGNGED
51 HCEGQQCFSS LSINDGFHVV QKGCFFVVEQ GKMTCKTPPS PGQAVECCQG
101 DWCNRNITAQ LPTKGSFPG TQNFHLETTGG GTHTCPCCPA PELLGGPSVF
151 LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQPPENNY
301 DTTTPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPG (SEQ ID NO: 136)

```

Сигнальная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK2-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 136 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ALK2-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 137):

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCATGGAAGA TGAGAAGCCC AAGGTCAACC
101 CCAAACCTCTA CATGTGTGTG TGTGAAGGTC TCTCCTGCGG TAATGAGGAC
151 CACTGTGAAG GCCAGCAGTG CTTTTCCTCA CTGAGCATCA ACGATGGCTT
201 CCACGTCTAC CAGAAAAGGCT GCTTCCAGGT TTATGAGCAG GGAAAGATGA
251 CCTGTAAGAC CCCGCCGTCC CCTGGCCAAG CTGTGGAGTG CTGCCAAGGG
301 GACTGGTGTA ACAGGAACAT CACGGCCAG CTGCCCACTA AAGGAAAATC
351 TTCCCTGGA ACACAGAATT TCCACTTGGA GACCGGTGGT GGAACACACA
401 CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
451 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
501 GGTACATGC GTGGTGGTG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
751 CAGCCCCGAG AACCCACAGT GTACACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT
801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGC TTCTATCCCA
851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACCTAC
901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAAC GTCTTTCAT
1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1051 TCCCTGTCTC CGGGT (SEQ ID NO: 137)

```

Последовательность зрелого слитого белка ALK2-Fc (SEQ ID NO: 138) является следующей и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

```

1 MEDEKPKVNP KLYMVCVEGL SCGNEDHCEG QQCFSSLSIN DGFHVYQKGC
51 FQVYEQGKMT CKTPPSPGQA VECCQGDWCN RNITAQLPTK GKSFPQTQNF
101 HLETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTP PVLDSDGSEFF LYSDLTVDKS
301 RWQQGNVFC SVMEALHNN YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 138)

```

Слитые белки ActRIIB-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 138, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK2-Fc.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, проиллюстрированных в последовательностях полипептидов ActRIIB-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 401-402 и 421-422, соответственно, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида ActRIIB-Fc рассмотрены в примере 1.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK2-Fc (SEQ ID NO: 421) является следующей:

```

1 MDAMKRGLECC VLLLCGAVFV SPGAMEDEKP KVNPKLYMCV CEGLSGCGNED
51 HCEGQQCFSS LSINDGFHVV QKGCQVYEQ GKMTCKTPPS PGQAVECCQG
101 DWCNRNITAO LPTKGSFPG TQNFHLETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLGCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
301 KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK (SEQ ID NO: 421)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401 и 402 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK2 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Более того, С-концевой остаток лизина Fc-домена может быть удален. Амино-

кислотная последовательность SEQ ID NO: 421 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK2-Fc (SEQ ID NO: 422) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 MEDEKPKVNP KLYMVCVEGL SCGNEDHCEG QQCFSSLSIN DGFHVYQKGC
51 FQVYEQGKMT CKTPPSPGQA VECCQGDWCN RNITAQLPTK GKSFPGTQNF
101 HLETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPSPR EEMTKNQVSL
251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LVSKLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMNEALHNNH YTKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 422)

```

Белки ActRIIB-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 402 и SEQ ID NO: 422, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK2-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIB-Fc:ALK2-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусом и заменой буфера.

Пример 10. Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK2-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK2-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом ActRIIB-Fc:ALK2-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами ActRIIB-Fc и ALK2-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK2-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK2-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK2-Fc									
Лиганд	Гомодимер ActRIIB-Fc			Гомодимер ALK2-Fc			Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	1,2×10 ⁷	1,7×10 ⁻⁴	15	Нет связывания			3,4×10 ⁷	2,6×10 ⁻³	76
Активин В	3,8×10 ⁶	1,1×10 ⁻⁴	28	Нет связывания			3,2×10 ⁶	1,5×10 ⁻⁴	47
BMP5	3,8×10 ⁶	3,7×10 ⁻²	9700	Нет связывания			1,2×10 ⁶	1,4×10 ⁻³	1200
BMP7	8,8×10 ⁶	1,4×10 ⁻²	1600	Нет связывания			1,5×10 ⁷	2,6×10 ⁻³	170
BMP9	3,9×10 ⁷	1,3×10 ⁻³	34	Нет связывания			3,2×10 ⁶	8,9×10 ⁻⁴	280
BMP10	5,4×10 ⁷	2,8×10 ⁻⁴	5	Нет связывания			5,5×10 ⁷	2,9×10 ⁻³	53
GDF3	1,2×10 ⁶	2,0×10 ⁻³	1700	Нет связывания			1,8×10 ⁶	1,2×10 ⁻²	6500
GDF5	1,2×10 ⁶	1,4×10 ⁻³	1100	Нет связывания			8,8×10 ⁵	4,4×10 ⁻³	5000
GDF6	1,5×10 ⁵	5,7×10 ⁻³	39000	Нет связывания			Временное*		> 240000
GDF8	2,5×10 ⁶	3,2×10 ⁻⁴	130	Нет связывания			2,1×10 ⁶	7,3×10 ⁻⁴	360
GDF11	2,0×10 ⁶	2,2×10 ⁻⁴	110	Нет связывания			1,6×10 ⁶	9,3×10 ⁻⁴	600

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc проявляет профиль связывания лиганда, отличный как от гомодимера ActRIIB-Fc, так и от гомодимера

ALK2-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc демонстрирует предпочтительное и прочное связывание с активинном В, таким образом, являясь сходным с гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK7-Fc (см. пример 8). Однако гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc отличается от ActRIIB-Fc:ALK7-Fc частично сохранением прочного связывания с BMP9, характерного для гомодимера ActRIIB-Fc, в то время как ActRIIB-Fc:ALK7-Fc связывает BMP9 очень слабо, или даже не связывает его. Исследованные лиганды не связывали гомодимер ActRIIB-Fc. См. фиг. 9.

Эти результаты демонстрируют, что гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc является более селективным антагонистом активина В по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc. Следовательно, гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK2-Fc будет полезным в определенных применениях, где такой селективный антагонизм является преимущественным. Примеры включают терапевтические применения, где желательно сохранить антагонизм в основном активину В и дополнить его вторичным антагонизмом BMP9, GDF8 и GDF11.

Пример 11. Получение гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK5-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс ActRIIB-Fc:ALK5-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIB человека и ALK5 человека, каждый из которых был слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIB-Fc и ALK5-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIB-Fc:ALK5-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, предоставлены в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 100-102.

В комплементарном слитом белке ALK5-Fc используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей (SEQ ID NO: 139):

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAALLPGA TALQCFCCHLC TKDNFTCVTD
51 GLCFVSVTET TDKVIHNSMC IAEIDLIPRD RPFVCPASSK TGSVTTTYCC
101 NQDHCNKIEL PTTVKSSPGL GPVETGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
151 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
201 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKQQR
251 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYDTT
301 PVLDSGDSF FLYSDLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
351 PG (SEQ ID NO: 139)

```

Сигнальная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK5-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 139 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитый белок ALK5-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 140):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCGCTGCT CCCGGGGGCG ACGGCCTTAC
 101 AGTGTTCCTG CCACCTCTGT ACAAAGACA ATTTACTTGT TGTGACAGAT
 151 GGGCTCTGCT TTGTCTCTGT CACAGAGACC ACAGACAAAG TTATACACAA
 201 CAGCATGTGT ATAGCTGAAA TTGACTTAAT TCCTCGAGAT AGGCCGTTTG
 251 TATGTGCACC CTCTTCAAAA ACTGGGTCTG TGA CTACAAC ATATTGCTGC
 301 AATCAGGACC ATTGCAATAA AATAGA ACTT CCAACTACTG TAAAGTCATC
 351 ACCTGGCCTT GGTCTGTGG AAACCGGTGG TGGA ACTCAC ACATGCCAC
 401 CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 451 CCAA AACCCA AGGACACCTT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG
 501 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
 551 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
 601 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
 651 GGA CTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGTCTTCC AACAAAGCCC
 701 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
 751 GAACCACAGG TGTACACCTT GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA
 801 CCA GTTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTCTATATCC AGCGACATCC
 851 CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CGACACCACG
 901 CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTATA GCGACCTCAC
 951 CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA
 1001 TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT
 1051 CCGGGT (SEQ ID NO: 140)

Последовательность зрелого слитого белка ALK5-Fc (SEQ ID NO: 141) является следующей и обязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

1 ALLPGATALQ CFCHLCTKDN FTCVTDGLCF VSVTETTDKV IHNSMCIAEI
 51 DLIPRDRPFV CAPSSKTGSV TTYCCNQDH CNKIELPTTV KSSPGLGPVE
 101 TGGGTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRPE VTCVVVDVSH
 151 EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDNLNGKE
 201 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
 251 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYDTTPPV L DSDGSFFLYS DLTVDKSRWQ
 301 QGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO: 141)

Слитые белки ActRIIB-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 141, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK5-Fc.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, проиллюстрированных в последовательностях полипептидов ActRIIB-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 401-402 и 423-424, соответственно, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида ActRIIB-Fc рассмотрены в примере 1.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK5-Fc (SEQ ID NO: 423) является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAALLPGA TALQCFCFLC TKDNFTCVTD
 51 GLCFVSVTET TDKVIHNSMC IAEIDLIPRD RPFVCA PSSK TGSVTTTYCC
 101 NQDHCNKIEL PTTVKSSPGL GPVETGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 151 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 201 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKQPR
 251 EPQVCTLPPS REEMTKNQS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT
 301 PPVLDSDGSF FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSL
 351 PGK (SEQ ID NO: 423)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401 и 402 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK5 может быть внесено четыре аминокислотных замены как указано двойным подчеркиванием выше. Более того, С-концевой остаток лизина Fc-домена может быть удален. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 423 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK5-Fc (SEQ ID NO: 424) является следующей и обязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 ALLPGATALQ CFCHLCTKDN FTCVTDGLCF VSVTETTDKV IHNSMCIAEI
 51 DLIPRDRPFV CAPSSKTGSV TTYCCNQDH CNKIELPTTV KSSPGLGPVE
 101 TGGGTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
 151 EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
 201 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSREEM TKNQVLSLCA
 251 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ
 301 QGNVFSVCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 424)

Белки ActRIIB-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 402 и SEQ ID NO: 424, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK5-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIB-Fc:ALK5-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусом и заменой буфера.

Пример 12. Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIB-Fc:ALK5-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK5-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом ActRIIB-Fc:ALK5-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами ActRIIB-Fc и ALK5-Fc. Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK5-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK5-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK5-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK5-Fc									
Лиганд	Гомодимер ActRIIB-Fc			Гомодимер ALK5-Fc			Гетеродимер ActRIIB-Fc:ALK5-Fc		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	1,2×10 ⁷	2,3×10 ⁻⁴	19	Нет связывания			3,6×10 ⁷	1,6×10 ⁻³	46
Активин В	5,1×10 ⁶	1,0×10 ⁻⁴	20	Нет связывания			3,9×10 ⁶	3,1×10 ⁻⁴	79
BMP6	6,4×10 ⁶	7,0×10 ⁻³	1100	Нет связывания			9,3×10 ⁶	1,5×10 ⁻²	1700
BMP9	3,9×10 ⁷	1,3×10 ⁻³	34	Нет связывания			Временное*		> 6600
BMP10	2,1×10 ⁷	3,8×10 ⁻⁴	18	Нет связывания			2,3×10 ⁷	2,2×10 ⁻³	150
GDF3	4,7×10 ⁵	1,8×10 ⁻³	3900	Нет связывания			1,1×10 ⁵	9,7×10 ⁻³	8500
GDF8	1,2×10 ⁶	1,9×10 ⁻⁴	160	Нет связывания			1,1×10 ⁶	5,2×10 ⁻⁴	490
GDF11	1,9×10 ⁶	1,4×10 ⁻⁴	74	Нет связывания			2,3×10 ⁶	4,6×10 ⁻⁴	600

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия

Пример 13. Получение гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK6-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ActRIIB-Fc:ALK6-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIB человека и ALK6 человека, каждый из которых может быть слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIB-Fc и ALK6-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIB-Fc:ALK6-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 100-102.

В комплементарном слитом белке ALK6-Fc используется лидерная последовательность ТРА, и он является следующим (SEQ ID NO: 142):

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAKKEDGE STAPTPRPKV LRCKCHHNCP
 51 EDSVNNICST DGYCFTMIEE DDSGLPVVTS GCLGLEGSDF QCRDTIPIHQ
 101 RRSIECCTER NECNLDLHPT LPPLKNRDFV DGPIHHRTGG GTHCPPCPA
 151 PELLGGPSVF LFPPPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
 251 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEV
 301 ESNGQPENNY DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
 351 LHNHYTQKSL SLSPG (SEQ ID NO: 142)

Сигнальная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIB-Fc:ALK6-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 142 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ALK6-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 143):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCAAGAAAGA GGATGGTGAG AGTACAGCCC
 101 CCACCCCGG TCCAAGGTC TTGCGTTGTA AATGCCACCA CCATTGTCCA
 151 GAAGACTCAG TCAACAATAT TTGCAGCACA GACGGATATT GTTTCACGAT
 201 GATAGAAGAG GATGACTCTG GGTGCCTGT GGTCACTTCT GGTGCCTAG
 251 GACTAGAAGG CTCAGATTTT CAGTGTGGG AACTCCCAT TCCTCATCAA
 301 AGAAGATCAA TTGAATGCTG CACAGAAAGG AACGAATGTA ATAAAGACCT
 351 ACACCCTACA CTGCCTCCAT TGAAAAACAG AGATTTTGTG GATGGACCTA
 401 TACACCACAG GACCGGTGGT GGAACACACA CATGCCACC GTGCCAGCA
 451 CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTCCCCC CAAAACCCAA
 501 GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG
 551 ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
 601 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG
 651 CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGGTGA
 701 ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC
 751 ATCGAGAAAA CCATCTCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACACAGGT
 801 GTACACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC
 851 TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
 901 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC GACACCACGC STCCCGTGCT
 951 GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CGACCTCACC GTGGACAAGA
 1001 GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
 1051 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGT
 (SEQ ID NO: 143)

Последовательность зрелого слитого белка ALK6-Fc (SEQ ID NO: 144) является следующей и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

1 KKEDGESTAP TPRPKVLRCK CHHNCPEDSV NNICSTDGYC FTMIEEDDSG
 51 LPVVTSGLG LEGSDFQCRD TPIPHQRSSI ECCTERNECN KDLHPTLPPL
 101 KNRDFVDGPI HHRRTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 151 TREVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
 251 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSGDSFF
 301 LYSDLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSLP G (SEQ ID
 NO: 144)

Слитые белки ActRIIB-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 144, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK6-Fc.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, проиллюстрированных в последовательностях полипептидов ActRIIB-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 401-402 и 425-426, соответственно, Fc-домены можно изменять для внесения комплементарного гидрофобного взаимодействия и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида ActRIIB-Fc рассмотрены в примере 1.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK6-Fc (SEQ ID NO: 425) является следующей:

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAKKEDGE STAPTRPKV LRCKCHHHC
51 EDSVNNICST DGYCFTMIEE DDSGLPVVTS GCLGLEGSDF QCRDTPIPHQ
101 RRSIECCTER NECNLDLHPT LPPLKNRDFV DGPINHRITGG GTHTCPPCPA
151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
251 IEKTISKAKG QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPDIAVEW
301 ESNQOPENNY KTRPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQGN VFSCSVMHEA
351 LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 425)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401 и 402 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK6 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Более того, С-концевой остаток лизина Fc-домена может быть удален. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 425 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK6-Fc (SEQ ID NO: 426) также может быть следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 KKEDGESTAP TPRPKVLRCK CHHHCPEDSV NNICSTDGYC FTMIEEDDSG
51 LPVVTSGCLG LEGSDFQCRD TPIPHQRRSI ECCTERNECN KDLHPTLPPL
101 KNRDFVDGPI HRRTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWWVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPSPR
251 EEMTKNQVSL SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTRP PVLDSGDSFF
301 LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID
NO: 426)

```

Белки ActRIIB-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 402 и SEQ ID NO: 426, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIB-Fc:ALK6-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIB-Fc:ALK6-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзивная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусом и заменой буфера.

Пример 14. Получение гетеродимера ActRIIA-Fc:ALK4-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс ActRIIA-Fc:ALK4-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIA человека и ALK4 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид ActRIIA-Fc и слитый полипептид ALK4-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIA-Fc:ALK4-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия.

Последовательность полипептида ActRIIA-Fc (SEQ ID NO: 118) показана ниже:

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAILGRS ETQECLFNA NWEKDRTNQT
51 GVEPCYGDKD KRRHCFATWK NISGSIEIVK QGCWLDINC YDRDTCVEKK
101 DSPEVYFCCC EGNMCNEKFS YFPMEVTPQ TSNPVTPKPP TGGGTHTCPP
151 CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
201 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
251 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRKEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
301 VEWESNGQPE NNYKTRPPVL KSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
351 HEALHNNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 118)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc:ALK4-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка ActRIIA может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатком лизина) как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 118 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ActRIIA-Fc кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 119):

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTATACT TGGTAGATCA GAAACTCAGG
101 AGTGTCTTTT CTTTAATGCT AATTGGGAAA AAGACAGAAC CAATCAAAC
151 GGTGTTGAAC CGTGTATGCG TGACAAAGAT AAACGGCGGC ATTGTTTTGC
201 TACCTGGAAG AATATTTCTG GTTCCATTGA AATAGTGAAA CAAGGTTGTT
251 GGCTGGATGA TATCAACTGC TATGACAGGA CTGATTGTGT AGAAAAAAAA
301 GACAGCCCTG AAGTATATTT CTGTTGCTGT GAGGGCAATA TGTGTAATGA
351 AAAGTTTTCT TATTTTCCGG AGATGGAAGT CACACAGCCC ACTTCAAATC
401 CAGTTACACC TAAGCCACCC ACCGGTGGTG GAACTCACAC ATGCCACCG
451 TGCCAGCAC CTGAACCTCT GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
501 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG
551 TGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC
601 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA
651 GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG
701 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
751 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA
801 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GAAGGAGATG ACCAAGAACC
851 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC
901 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC
951 TCCCGTGCTG AAGTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTATAGC AAGCTCACCG
1001 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCGGTGATG
1051 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1101 GGGTAAA (SEQ ID NO: 119)

```

Зрелый слитый полипептид ActRIIA-Fc (SEQ ID NO: 120) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
51 IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
101 EVTQPTSNPV TPKPPTGGGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PEKPKDTLMI
151 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
201 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
251 SRKEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLKSDGS
301 FFLYSLKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 120)

```

В этом первом подходе полипептидная последовательность комплементарного слитого белка ALK4-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 104-106.

Белки ActRIIA-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 106, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:ALK4-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи.

Последовательность полипептида ActRIIA-Fc (SEQ ID NO: 409) показана ниже:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAILGRS ETQECLFFNA NWEKDRTNQT
51 GVEPCYGDKD KRRHCFATWK NISGSIEIVK QGCWLLDDINC YDRDTCVEKK
101 DSPEVYFCCC EGNMCNEKFS YFPEMEVTQP TSNPVTPKPP TGGGTHTCPP
151 CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
201 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
251 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA
301 VEWESNGQPE NNYKTPPVVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSQVM
351 HEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 409)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc:ALK4-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 409 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком ли-

зина на С-конце.

Зрелый слитый полипептид ActRIIA-Fc (SEQ ID NO: 410) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
51 IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
101 EVTQPTSNPV TPKPPTGGGT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
151 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
201 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
251 CREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS
301 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 410)

```

В этом втором подходе полипептидная последовательность комплементарного слитого белка ALK4-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 403-404.

Белки ActRIIA-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 404, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:ALK4-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIA-Fc:ALK4-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 15. Профиль связывания лиганда гетеродимером ActRIIA-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK4-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом ActRIIA-Fc:ALK4-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами ActRIIA-Fc и ALK4-Fc. Гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK4-Fc независимо улавливали на системе с использованием анти-тела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера ActRIIA-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIA-Fc и гомодимером ALK4-Fc									
Лиганд	Гомодимер ActRIIA-Fc			Гомодимер ALK4-Fc			Гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc		
	K_a (1/M с)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/M с)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/M с)	K_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	$1,4 \times 10^7$	$6,2 \times 10^{-4}$	45	$5,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-2}$	20000	$7,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-4}$	32
Активин В	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{-4}$	10	Нет связывания			$9,5 \times 10^6$	$4,8 \times 10^{-4}$	50
Активин АВ	$2,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^{-4}$	9	$1,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^{-3}$	2000	$1,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^{-4}$	13
Активин АС	$2,2 \times 10^7$	$7,9 \times 10^{-3}$	360	Нет связывания			$3,2 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-4}$	170
BMP6	$2,7 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{-2}$	800	Нет связывания			$5,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-2}$	2200
BMP7	$8,9 \times 10^6$	$3,3 \times 10^{-2}$	3700	Нет связывания			$2,0 \times 10^7$	$7,2 \times 10^{-2}$	3500
BMP9	Временное*		>10000	---			Нет связывания		
BMP10	$2,9 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-3}$	85	Нет связывания			Временное*		>6000
GDF3	$1,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^{-3}$	2400	---			$4,9 \times 10^7$	$4,8 \times 10^{-3}$	9800
GDF8	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-3}$	99	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-3}$	15000	$1,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^{-3}$	150
GDF11	$7,3 \times 10^7$	$9,2 \times 10^{-4}$	13	$5,0 \times 10^6$	$4,8 \times 10^{-3}$	970†	$3,0 \times 10^7$	$6,5 \times 10^{-4}$	22

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия
† Очень низкий сигнал
--- Не тестировали

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc имеет измененный профиль/селективность связывания относительно как гомодимера ActRIIA-Fc, так и гомодимера ALK4-Fc. Например, гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc демонстрирует усиленное связывание с активинном А, и, в частности, усиленное связывание с активинном АС, по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc, сохраняя сильное связывание с активинном АВ и GDF11. Кроме того, лиганд с наиболее высокой аффинностью в отношении гомодимера ActRIIB-Fc, активин В, демонстрирует сниженную аффинность (хотя все еще в диапазоне высокой аффинности) в отношении гетеродимера ActRIIA-Fc:ALK4-Fc. Гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc также демонстрирует значительно сниженное связывание с BMP10 по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc. См. фиг. 10.

Эти результаты демонстрируют, что гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc является более селективным антагонистом активина А и активина АВ относительно активина В, чем гомодимер ActRIIB-Fc. Кроме того, гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc обладает существенно увеличенной аффинностью в отношении активина АС и значительно сниженной аффинностью в отношении BMP10 по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc. Следовательно, гетеродимер ActRIIA-Fc:ALK4-Fc будет более пригодным, чем гомодимер ActRIIB-Fc, в определенных применениях, где такой селективный антагонизм является преимущественным. Примеры включают терапевтические применения, где является желательным антагонизм активину А и/или активину АВ предпочтительно относительно активина В, и достижение сильного ингибирования активина АС, избегая ингибирования BMP10.

Пример 16. Получение гетеродимера BMPRII-Fc:ALK1-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс BMPRII-Fc:ALK1-Fc, содержащий внеклеточные домены BMPRII человека и ALK1 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид BMPRII-Fc и слитый полипептид ALK1-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них представлены ниже.

Образованию гетеродимерного BMPRII-Fc:ALK1-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхности взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхности взаимодействия.

Последовательность полипептида BMPRII-Fc (SEQ ID NO: 121) представлена ниже:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASQNQER LCAFKDPYQQ DLGIGESRIS
 51 HENG**T**ILCSK GSTCYGLWEK SKGDINLVKQ GCWSHIGDPQ ECHYE**E**CVVT
 101 TTPPSIQNGT YRFCC**C**STD**L** CNVNFTENFP PPD**T**TPLSPP HSFNRDE**TGG**
 151 GTHTC**P**PCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 201 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 251 KVS**N**KALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSR**K**EMTKN QVSLTCLVKG
 301 FYP**S**DI**A**VEW ESNGQPENNY K**T**TPPV**LK**SD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 351 VFSCSV**M**HEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 121)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ВМРІІ-Fc:ALK1-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов в Fc-домен слитого полипептида ВМРІІ-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 121 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ВМРІІ-Fc кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 122):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCGCAGAA TCAAGAACGC STATGTGCGT
 101 TTAAGATCC GTATCAGCAA GACCTTGGGA TAGGTGAGAG TAGAATCTCT
 151 CATGAAAATG GGACAATATT ATGCTCGAAA GGTAGCACCT GCTATGGCCT
 201 TTGGGAGAAA TCAAAAGGGG ACATAAATCT TGTA^{AA}ACAA GGATGTTGGT
 251 CTCACATTGG AGATCCCCAA GAGTGTCACT ATGAAGAATG TGTAGTAACT
 301 ACCACTCCTC CCTCAATTCA GAATGGAACA TACCGTTTCT GCTGTTGTAG
 351 CACAGATTTA TGTAATGTCA ACTTTACTGA GAATTTTCCA CCTCCTGACA
 401 CAACACCACT CAGTCCACCT CATTCAITTA ACCGAGATGA GACCGGTGGT
 451 GGAAC**T**CACA CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC
 501 GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
 551 GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
 601 GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
 651 GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG
 701 TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
 751 AAGGTCTCCA ACAAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA
 801 AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC
 851 GGAAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
 901 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GCGAGCCGGA
 951 GAACAAC**T**AC AAGACCACGC CTCCCGTCT GAAGTCCGAC GGCTCCTCT
 1001 TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
 1051 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
 1101 GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO: 122)

Зрелый слитый полипептид ВМРІІ-Fc (SEQ ID NO: 123) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 SQ**N**QERLCAF KDPYQQDLGI GESRISHENG TILCSKGSTC YGLWEKSKGD
 51 INLVKQGCWS HIGDPQECHY EECVVTTPP SIQNGTYRFC CCSTDLCNVN
 101 FTENFPPPD**T** TPLSPPHSFN RDE**T**GGG**T**HT CPPCPAPE**L**L GGPSVFLFPP
 151 KPKDTLMIS**R** TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF N**W**YVDGVEVH NAKTKPREEQ
 201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 251 PQVYTLPPSR KEMTKNQVSL T**C**LVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYK**T**P
 301 PVLKSDGSFF LYSKLTVDKS R**W**QQGNVFSC SVMHEALH**N**H Y**T**QKSLSLSP
 351 GK (SEQ ID NO: 123)

Комплементарная форма слитого полипептида ALK1-Fc (SEQ ID NO: 124) является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGADPVKPS RGPLVTCTCE SPHCKGPTCR
 51 GAWCTVVLVR EEGRHPQEHR GCGNLHRELC RGRPTEFVNH YCCDShLcNH
 101 NVSLVLEATQ PPSEQPGTDG QLATGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
 151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKQPRE
 251 PQVYTLPPSR EEMTKQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP
 301 PVLDSGGSFF LYS~~DL~~TVDKS RWQQGNVFS~~C~~ SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
 351 G (SEQ ID NO: 124)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера со слитым полипептидом BМРRII-Fc SEQ ID NO: 121 и 123 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK1-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 124 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок ALK1-Fc кодируется следующей нуклеиновой кислотой (SEQ ID NO: 125):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGC CCGACCCTGT GAAGCCGTCT CGGGCCCCGC
 101 TGGTGACCTG CACGTGTGAG AGCCACATT GCAAGGGGCC TACCTGCCGG
 151 GGGGCTGGT GCACAGTAGT GCTGGTGGG GAGGAGGGGA GGCACCCCCA
 201 GGAACATCGG GGCTGCGGGA ACTTGCACAG GGAGCTCTGC AGGGGCCGCC
 251 CCACCGAGTT CGTCAACCAC TACTGCTGCG ACAGCCACCT CTGCAACCAC
 301 AACGTGTCCC TGGTGTGGA GGCCACCCAA CCTCCTTCGG AGCAGCCGGG
 351 AACAGATGGC CAGCTGGCCA CCGTGGTGG AACTCACACA TGCCACCGT
 401 GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
 451 AAACCAAGG ACACCCCAT GATCTCCCG ACCCCTGAGG TCACATGCGT
 501 GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG
 551 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG
 601 TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA
 651 CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC
 701 CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
 751 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA
 801 GGTACGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT STATCCAGC GACATCGCCG
 851 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACGA CACCACGCCT
 901 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCG ACCTACCGT
 951 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
 1001 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 1051 GGT (SEQ ID NO: 125)

Последовательность зрелого слитого белка ALK1-Fc (SEQ ID NO: 126) является следующей и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

1 DPVKPSRGPL VTCTCESPHC KGPTCRGAWC TVVLVREEGR HPQEHRCGN
 51 LHRELCRGRP TEFVNHYCCD SHLCNHNVS LVEATQPPSE QPGTDGQLAT
 101 GGGTHTCPPC PARELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHЕ
 151 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNKEY
 201 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV
 251 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYDTTPPVLD SDGSFFLYSD LTVDKSRWQQ
 301 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG (SEQ ID NO: 126)

Белки BМРRII-Fc и ALK1-Fc SEQ ID NO: 123 и SEQ ID NO: 126, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BМРRII-Fc:ALK1-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи.

Последовательность полипептида BМРRII-Fc (SEQ ID NO: 411) показана ниже:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASQNQER LCAFKDPYQQ DLGIGESRIS
 51 HENGTILCSK GSTCYGLWEK SKGDINLVKQ GCWSHIGDPQ ECHYECCVVT
 101 TTPPSIQNGT YRCCCSTDL CNVNFTEFP PPDTPPLSPP HSFNRDETGG
 151 GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 201 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 251 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PQCREEMTKN QVSLWCCLKG
 301 FYPVDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 351 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 411)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера BМРRII-Fc:ALK1-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 411 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Зрелый слитый полипептид BМРRII-Fc (SEQ ID NO: 412) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина (K) на С-конце.

1 SQNQLERLCAF KDPYQQDLGI GESRISHENG TILCSKGSTC YGLWEKSKGD
 51 INLVKQGCWS HIGDPQECHY EECVVTTTPP SIQNGTYRFC CCSTDLCNVN
 101 FTENFPPPD TPLSPPHSFN RDETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
 151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 251 PQVYTLPPQR EEMTKNQVSL WCCLKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
 301 PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
 351 GK (SEQ ID NO: 412)

Комплементарная форма слитого полипептида ALK1-Fc (SEQ ID NO: 413) является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGADPVKPS RGPLVTCTCE SPHCKGPTCR
 51 GAWCTVVLVR EEGRHPQHR GCGNLHREL RGRPTEFVNH YCCDHLCHN
 101 NVSLVLEATQ PPSEQPGTDG QLATGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
 151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 251 PQVTLPPSR EEMTKNQVSL SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
 301 PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
 351 GK (SEQ ID NO: 413)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BМРRII-Fc SEQ ID NO: 411 и 412 выше в Fc-домен слитого полипептида ALK1 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 413 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK1-Fc (SEQ ID NO: 414) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 DPVKPSRGLP VTCTCESPHC KGPTCRGAWC TVVLVREGR HPQHRGCGN
 51 LHRELRCRGRP TEFVNHYCCD SHLCNHNVS LVEATQPPSE QPGTDQLAT
 101 GGGTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPPEV TCVVVDVSHE
 151 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVSVLTVL HQDWLNKEY
 201 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSREEMT KNQVSLSCAV
 251 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 301 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 414)

Белки BМРRII-Fc и ALK1-Fc SEQ ID NO: 412 и SEQ ID NO: 414, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BМРRII-Fc:ALK1-Fc.

Очистка различных комплексов BМРRII-Fc:ALK1-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусом и заменой буфера.

Пример 17. Профиль связывания лиганда гетеродимером BМРRII-Fc:ALK1-Fc по сравнению с го-

модимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK1-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом BMPRII-Fc:ALK1-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами BMPRII-Fc и ALK1-Fc. Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc, гомодимер BMPRII-Fc и гомодимер ALK1-Fc независимо улавливали на системе с использованием анти-тела против Fc. Инъектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимером BMPRII-Fc:ALK1-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK1-Fc									
Лиганд	Гомодимер BMPRII-Fc			Гомодимер ALK1-Fc			Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)
BMP9	1,2×10 ⁷	2,6×10 ⁻²	2100	7,8×10 ⁶	1,3×10 ⁻⁴	16	1,2×10 ⁶	4,1×10 ⁻⁴	360
BMP10	2,6×10 ⁷	2,5×10 ⁻³	100	4,1×10 ⁶	1,6×10 ⁻⁴	38	1,5×10 ⁷	3,5×10 ⁻⁴	23
BMP15	9,9×10 ⁶	2,8×10 ⁻³	290	Нет связывания			1,2×10 ⁷	4,2×10 ⁻²	3500

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc имеет профиль/селективность связывания, которые отличаются от гомодимера BMPRII-Fc, но сходны с гомодимером ActRIIB-Fc. Например, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc в основном сохраняет прочное связывание с BMP9 и BMP10, характерное для гомодимера ActRIIB-Fc; однако гетеродимер демонстрирует умеренную селективность в отношении BMP10 относительно BMP9, отсутствующую у гомодимера. Также в отличие от гомодимера ALK1-Fc, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc связывается с BMP15, хотя и с более слабой аффинностью приблизительно на порядок величины, чем у гомодимера BMPRII-Fc. См. фиг. 11. Следовательно, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK1-Fc неожиданно будет полезным в определенных терапевтических применениях, где является преимущественным селективный антагонизм BMP9 и особенно BMP10, например, для ингибирования ангиогенеза или в способах применения, где также является преимущественным антагонизм BMP15.

Пример 18. Получение гетеродимера BMPRII-Fc:ALK2-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс BMPRII-Fc:ALK2-Fc, содержащий внеклеточные домены BMPRII человека и ALK2 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид BMPRII-Fc и слитый полипептид ALK2-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них представлены в настоящем описании.

Образованию гетеродимерного BMPRII-Fc:ALK2-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия. Последовательность слитого полипептида BMPRII-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая его, представлены выше в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 121-123. Для способствования образованию гетеродимера BMPRII-Fc:ALK2-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка BMPRII-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющие кислотные аминокислоты лизином), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 121 и 123 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидная последовательность комплементарного слитого полипептида ALK2-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 9 в качестве SEQ ID NO: 136-138. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BMPRII-Fc SEQ ID NO: 121 и 123, в Fc-домен слитого белка ALK2-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано в примере 9. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 136 и 138 необязательно могут быть предоставлены с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды BMPRII-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 123 и SEQ ID NO: 138, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BMPRII-Fc:ALK2-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гид-

рофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида BMPRII-Fc (SEQ ID NO: 411-412) рассмотрены в примере 16. Для способствования образованию гетеродимера BMPRII-Fc:ALK2-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен полипептида BMPRII-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 411 и 412 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидные последовательности комплементарного слитого полипептида ALK2-Fc (SEQ ID NO: 421-422) обсуждаются в примере 9. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BMPRII-Fc SEQ ID NO: 411-412 в Fc-домен слитого полипептида ALK2 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано в примере 9. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 421-422 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды BMPRII-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 412 и SEQ ID NO: 422, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BMPRII-Fc:ALK2-Fc.

Очистка различных комплексов BMPRII-Fc:ALK2-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзивная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 19. Профиль связывания лиганда гетеродимера BMPRII-Fc:ALK2-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK2-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом BMPRII-Fc:ALK2-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами BMPRII-Fc и ALK2-Fc. Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK2-Fc, гомодимер BMPRII-Fc и гомодимер ALK2-Fc независимо улавливали на системе с использованием анти-тела против Fc. Инъектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера BMPRII-Fc:ALK2-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK2-Fc									
Лиганд	Гомодимер BMPRII-Fc			Гомодимер ALK2-Fc			Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK2-Fc		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин В	1,9×10 ⁶	4,9×10 ⁻³	2600	Нет связывания			5,9×10 ⁵	3,1×10 ⁻³	5200
BMP5	1,9×10 ⁶	1,9×10 ⁻²	9900	Нет связывания			1,8×10 ⁶	5,0×10 ⁻³	2800
BMP7	Временное*		> 93000	Нет связывания			1,5×10 ⁷	1,2×10 ⁻²	760
BMP9	4,5×10 ⁷	7,3×10 ⁻²	1600	Нет связывания			1,0×10 ⁷	5,1×10 ⁻³	500
BMP10	3,8×10 ⁷	5,0×10 ⁻³	130	Нет связывания			1,1×10 ⁸	3,4×10 ⁻²	300
BMP15	5,8×10 ⁶	4,2×10 ⁻³	720	Нет связывания			9,6×10 ⁶	1,1×10 ⁻²	1100
* Не определено вследствие временной природы взаимодействия									

Пример 20. Получение гетеродимера BMPRII-Fc:ALK3-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс BMPRII-Fc:ALK3-Fc, содержащий внеклеточные домены BMPRII человека и ALK3 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид BMPRII-Fc и слитый полипептид ALK3-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них представлены в настоящем описании.

Образованию гетеродимерного BMPRII-Fc:ALK3-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия. Полипептидная последователь-

ность слитого полипептида BМPPII-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 121-123. Для способствования образованию гетеродимера BМPPII-Fc:ALK3-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка BМPPII-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 121 и 123 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидная последовательность комплементарного слитого полипептида ALK3-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 4 в качестве SEQ ID NO: 115-117. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BМPPII-Fc SEQ ID NO: 121 и 123 в Fc-домен слитого полипептида ALK3-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано в примере 4. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 115 и 117 необязательно могут быть предоставлены с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды BМPPII-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 123 и SEQ ID NO: 117, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BМPPII-Fc:ALK3-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида BМPPII-Fc (SEQ ID NO: 411-412) рассмотрены в примере 16. Для способствования образованию гетеродимера BМPPII-Fc:ALK3-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен полипептида BМPPII-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 411 и 412 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидные последовательности комплементарного слитого полипептида ALK3-Fc (SEQ ID NO: 407-408) рассмотрены в примере 4. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BМPPII-Fc SEQ ID NO: 411-412 в Fc-домен слитого полипептида ALK3 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано в примере 4. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 407 и 408 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды BМPPII-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 412 и SEQ ID NO: 408, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BМPPII-Fc:ALK3-Fc.

Очистка различных комплексов BМPPII-Fc:ALK3-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 21. Профиль связывания лиганда гетеродимером BМPPII-Fc:ALK3-Fc по сравнению с гомодимером BМPPII-Fc и гомодимером ALK3-Fc.

Анализ связывания на основе Viacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом BМPPII-Fc:ALK3-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерным комплексом BМPPII-Fc и гомодимерным комплексом ALK3-Fc. Гетеродимер BМPPII-Fc:ALK3-Fc, гомодимер BМPPII-Fc и гомодимер ALK3-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инъектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера BMPRII-Fc:ALK3-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK3-Fc									
Лиганд	Гомодимер BMPRII-Fc			Гомодимер ALK3-Fc			Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK3-Fc		
	K _a (1/Мс)	K _d (1/с)	K _b (пМ)	K _a (1/Мс)	K _d (1/с)	K _b (пМ)	K _a (1/Мс)	K _d (1/с)	K _b (пМ)
Активин В	2,0×10 ⁷	7,5×10 ⁻²	3800	Нет связывания			Минимальное связывание		
BMP2	Временное*		>2×10 ⁶	6,2×10 ⁵	1,4×10 ⁻⁴	230	2,9×10 ⁶	1,5×10 ⁻⁴	51
BMP4	---			2,6×10 ⁵	5,5×10 ⁻⁵	210	9,1×10 ⁵	9,1×10 ⁻⁵	100
BMP5	---			2,9×10 ⁴	2,3×10 ⁻³	70000	4,3×10 ⁵	1,4×10 ⁻³	3200
BMP6	Временное*		>8900	1,4×10 ⁵	4,9×10 ⁻³	35000	3,6×10 ⁵	5,9×10 ⁻⁴	1600
BMP7	Временное*		>38000	1,2×10 ⁶	1,8×10 ⁻²	15000	1,2×10 ⁷	1,2×10 ⁻²	1000
BMP9	1,2×10 ⁷	2,6×10 ⁻²	2100	Нет связывания			Нет связывания		
BMP10	2,6×10 ⁷	2,5×10 ⁻³	100	---			6,8×10 ⁵	1,6×10 ⁻³	2400
BMP15	9,9×10 ⁶	2,8×10 ⁻³	290	---			9,1×10 ⁵	5,5×10 ⁻³	6000
GDF5	Нет связывания			4,3×10 ⁵	1,1×10 ⁻²	22000	Минимальное связывание		
GDF6	Временное*		>88000	3,4×10 ⁴	1,3×10 ⁻³	40000	1,4×10 ⁶	1,9×10 ⁻³	1400
* Не определено вследствие временной природы взаимодействия --- Не исследовали									

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер BMPRII-Fc:ALK3-Fc обладает селективностью к лиганду, которая явно отличается от гомодимера BMPRII-Fc, но также отличается от гомодимера ActRIIB-Fc. Гомодимер BMPRII-Fc:ALK3-Fc связывается значительно прочнее с BMP6, чем гомодимер ALK3-Fc, что отражается в десять раз более медленной скоростью диссоциации. Ввиду по большей части неизменного связывания с BMP2 и BMP4, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK3, таким образом, можно считать общим ингибитором BMP2, BMP4 и BMP6. Этот профиль связывания контрастирует с профилем связывания гомодимером ActRIIB-Fc, чье исключительно прочное связывание с BMP4 и BMP2 идентифицирует его в качестве высоко селективного в отношении этой пары лигандов по сравнению с четырьмя лигандами с промежуточным уровнем связывания, включая BMP6. См. фиг. 12. Следовательно, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK3-Fc является неожиданно полезным в определенных терапевтических применениях, в которых является преимущественным совместный антагонизм BMP2, BMP4 и BMP6.

Пример 22. Получение гетеродимера BMPRII-Fc:ALK4-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс BMPRII-Fc:ALK4-Fc, содержащий внеклеточные домены BMPRII человека и ALK4 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид BMPRII-Fc и слитый полипептид ALK4-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них предоставлены в настоящем описании.

Образованию гетеродимерного BMPRII-Fc:ALK4-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия. Последовательность слитого полипептида BMPRII-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 121-123. Для способствования образованию гетеродимеру BMPRII-Fc:ALK4-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка BMPRII-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 121 и 123 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидная последовательность комплементарного слитого полипептида ALK4-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 104-106. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BMPRII-Fc SEQ ID NO: 121 и 123 в Fc-домен слитого полипептида ALK4-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано в примере 1. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 104 и 106 необязательно могут быть предоставлены с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды BMPRII-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 123 и SEQ ID NO: 106, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BMPRII-Fc:ALK4-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида BMPRII-Fc (SEQ ID NO: 411 и 412) рассмотрены в примере 16. Для способствования образованию гетеродимера BMPRII-Fc:ALK4-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен полипептида BMPRII-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 411 и 412 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидные последовательности комплементарного слитого полипептида ALK4-Fc (SEQ ID NO: 403 и 404) рассмотрены в примере 1. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом BMPRII-Fc SEQ ID NO: 411 и 412 в Fc-домен слитого полипептида ALK4 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано в примере 1. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 403 и 404 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды BMPRII-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 412 и SEQ ID NO: 404, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего BMPRII-Fc:ALK4-Fc.

Очистка различных комплексов BMPRII-Fc:ALK4-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 23. Профиль связывания лиганда гетеродимером BMPRII-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK4-Fc.

Анализ связывания на основе *Viascog*TM использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом BMPRII-Fc:ALK4-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами BMPRII-Fc и ALK4-Fc. Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc, гомодимер BMPRII-Fc и гомодимер ALK4-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимером BMPRII-Fc:ALK4-Fc по сравнению с гомодимером BMPRII-Fc и гомодимером ALK4-Fc									
Лиганд	Гомодимер BMPRII-Fc			Гомодимер ALK4-Fc			Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc		
	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (пМ)	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (пМ)
Активин А	Временное*		>43000	$5,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-2}$	2000	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	1100
Активин В	$2,0 \times 10^7$	$7,5 \times 10^{-2}$	3800	Нет связывания			$1,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{-3}$	1700
Активин АВ	---	---	---	$4,4 \times 10^6$	$6,4 \times 10^{-3}$	1500	$3,6 \times 10^6$	$5,0 \times 10^{-4}$	140
BMP9	$1,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^{-2}$	2100	Нет связывания			Временное*		>140000
BMP10	$2,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-3}$	100	Нет связывания			$8,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-3}$	2200
BMP15	$9,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^{-3}$	290	Нет связывания			$2,8 \times 10^7$	$4,8 \times 10^{-2}$	1700

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия
 --- Не исследовали

Эти сравнительные данные о связывании демонстрируют, что гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc обладает селективностью связывания лиганда, которая отличается от селективности связывания лиганда гомодимером BMPRII-Fc или гомодимером ALK4-Fc. Гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc отличается от обоих гомодимеров связыванием нескольких лигандов активина с высокой или промежуточной прочностью и отличается от гомодимера BMPRII-Fc только слабым связыванием BMP15. Наиболее примечательно, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc прочно и предпочтительно связывается с гетеродимерным лигандом активин АВ. См. фиг. 13. Следовательно, гетеродимер BMPRII-Fc:ALK4-Fc неожиданно будет полезным в определенных терапевтических применениях, где является преимущественным антагонизмом активину А, активину В и особенно активину АВ и где следует избегать антагонизма BMP15 (который в значительной степени вовлечен в овуляцию).

Пример 24. Получение гетеродимера TGFβRII-Fc:ALK1-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс TGFβRII-Fc:ALK1-Fc, содержащий внеклеточные домены короткой (канонической) изоформы TGFβRII человека и ALK1 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид TGFβRII_{SHORT}-Fc и слитый полипептид ALK1-Fc, соответственно, и последовательности каждого из них предоставлены в настоящем описании.

Образованию гетеродимерного TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK1-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия.

Последовательность полипептида TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 127) представлена ниже:

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51 QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAV RKNDENITLE
101 TVCHDPKLPY HDFILEDAAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SDECDNII
151 FSEYNTSNP DTGGGTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP
201 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT
251 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRKE
301 MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPVV LKSDGSFFLY
351 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNYT QKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 127)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK1-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 127 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок TGF β RII_{SHORT}-Fc кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 128):

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 TTAATAACGA CATGATAGTC ACTGACAACA ACGGTGCAGT CAAGTTTCCA
151 CAACTGTGTA AATTTTGTGA TGTGAGATTT TCCACCTGTG ACAACCAGAA
201 ATCCTGCATG AGCAACTGCA GCATCACCTC CATCTGTGAG AAGCCACAGG
251 AAGTCTGTGT GGCTGTATGG AGAAAGAATG ACGAGAACAT AACACTAGAG
301 ACAGTTTGCC ATGACCCCAA GCTCCCCTAC CATGACTTTA TTCTGGAAGA
351 TGCTGCTTCT CCAAAGTGCA TTATGAAGGA AAAAAAAAAAG CCTGGTGAGA
401 CTTTCTTCAT GTGTTCTGT AGCTCTGATG AGTGCAATGA CAACATCATC
451 TTCTCAGAAG AATATAACAC CAGCAATCCT GACACCGGTG GTGGAACSTA
501 CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT
551 TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
601 GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA
651 GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC
701 CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC
751 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC
801 CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAGG
851 GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGAAGGAG
901 ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC
951 CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACST
1001 ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGAAGTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAT
1051 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC
1101 ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC
1151 TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 128)

```

Зрелый слитый полипептид TGF β RII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 129) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 TTPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51 ITSICEKPE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FMCSCSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPDTGG GTHTCPPCPA
151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
251 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRKEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
301 ESNQQPENNY KTRPPVLKSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA
351 LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 129)

```

Полипептидная последовательность комплементарного слитого полипептида ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом TGF β RII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 127 и 129, в Fc-домен слитого белка ALK1-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 124 и 126 необязательно могут быть предоставлены с добавленным остатком лизина на С-конце.

Белки TGF β RII_{SHORT}-Fc и ALK1-Fc SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 126, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGF β RII_{SHORT}-Fc :ALK1-Fc.

Можно получать вариант гетеромерного комплекса TGF β RII-Fc:ALK1-Fc, в котором полипептид ALK1-Fc, описанный выше (SEQ ID NO: 126), образует пару со слитым белком Fc, содержащим внеклеточный домен длинной изоформы (A) TGF β RII (TGF β RII_{LONG}) вместо внеклеточного домена короткой изоформы.

Последовательность полипептида TGF β RII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 130) представлена ниже:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
 51 RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
 101 TSICEKPQEV CVAVWRKND E NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
 151 KEKKKPGETF FMCS~~SS~~DEC NDNIIFSEEY NTSNPDTGGG THTCPPCPAP
 201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
 301 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSR~~K~~EMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 351 SNGQPENNYK TTPPVLKSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 401 HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 130)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK1-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка TGFβRII_{LONG}-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющие кислотные аминокислоты лизином), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 130 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Этот слитый белок TGFβRII_{LONG}-Fc кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 131):

1 ATGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
 101 ATGTGGAAAT GGAGGCCAG AAAGATGAAA TCATCTGCC CAGCTGTAAT
 151 AGGACTGCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
 201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAAC GTGTAAATTT TGTGATGTGA
 251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
 301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
 351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
 401 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
 451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
 501 TGATGAGTGC AATGACAACTA TCATCTTCTC AGAAGAAATAT AACACCAAGCA
 551 ATCTTGACAC CGGTGGTGGG ACTCACACAT GCCCACCGTG CCCAGCACCT
 601 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCTC TTCCCCCAA AACCCAAGGA
 651 CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGACG
 701 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
 751 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC
 801 GTACCCTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCTC GCACCAGGAC TGGTGAATG
 851 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCATC
 901 GAGAAAACCA TC TCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCGAGAAC CACAGGTGTA
 951 CACCCTGCCC CCATCCCGGA AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
 1001 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
 1051 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGAA
 1101 GTCGACGGC TCCTTCTTCC TCTATAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA
 1151 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
 1201 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG GTAAA
 (SEQ ID NO: 131)

Зрелый слитый полипептид TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 132) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPCSNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCQDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAVAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEEYNTSN PDTGGGTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 201 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 251 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRK
 301 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLKSDGSFFL
 351 YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG K
 (SEQ ID NO: 132)

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи.

Последовательность полипептида TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 415) представлена ниже:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
 51 QLCKFCQDVR FSTCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAV WRKNDENITL
 101 TVCHDPKLPY HDFILEDAA S PKCMKEKKK PGETFFMCS S SDECNDNII
 151 FSEYNTSNP DTGGGTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPK KDTLMISRTP
 201 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT
 251 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPCREE
 301 MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LKSDGSFFLY
 351 SKLTVDKSRW QQGNVFCSSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 415)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK1-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 415 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Зрелый слитый полипептид TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 416) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на C-конце.

1 TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
 51 ITSICEKPQE VCAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
 101 MKEKKKPGET FFMCS CSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPDTGG GTHTCPPCPA
 151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP
 251 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPCREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW
 301 ESNQGPENNY KTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMNEA
 351 LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 416)

Полипептидные последовательности комплементарного слитого полипептида ALK1-Fc (SEQ ID NO: 413 и 414) рассмотрены в примере 16. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом TGFβRII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 415 и 416 в Fc-домен слитого полипептида ALK1 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано в примере 16. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 413 и 414 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на C-конце.

Белки TGFβRII_{SHORT}-Fc и ALK1-Fc SEQ ID NO: 416 и SEQ ID NO: 414, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGFβRII-Fc:ALK1-Fc.

Можно получать вариант гетеромерного комплекса TGFβRII-Fc:ALK1-Fc, в котором полипептид ALK1-Fc, описанный выше (SEQ ID NO: 414), образует пару со слитым белком Fc, содержащим внеклеточный домен длинной изоформы (A) of TGFβRII (TGFβRII_{LONG}) вместо внеклеточного домена короткой изоформы.

Последовательность полипептида TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 417) представлена ниже:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
 51 RTAHLPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
 101 TSICEKPQEV CVAVWRKNDE NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
 151 KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEEY NTSNPDTGGG THTCPPCPAP
 201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
 301 EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PCREEMTKNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE
 351 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 401 HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 417)

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK1-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 417 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Зрелый слитый полипептид TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 418) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на C-конце.

1 TIPPVHQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEEYNTSN PDTGGGTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 201 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 251 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPCRE
 301 EMTKNQVSLW CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSGDSFFL
 351 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
 (SEQ ID NO: 418)

Белки TGFβRII_{LONG}-Fc и ALK1-Fc SEQ ID NO: 418 и SEQ ID NO: 414, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK1-Fc.

Очистка различных комплексов TGFβRII-Fc:ALK1-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзивная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 25. Профиль связывания лиганда гетеродимера TGFβRII-Fc:ALK1-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK1-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерным комплексом TGFβRII_{SHORT}-Fc :ALK1-Fc, описанным выше, с селективностью связывания лиганда гомодимерными комплексами TGFβRII_{SHORT}-Fc и гомодимерными комплексами ALK1-Fc. Гетеродимер TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK1-Fc, гомодимер TGFβRII_{SHORT}-Fc и гомодимер ALK1-Fc независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лиганда гетеродимера TGFβRII _{SHORT} -Fc:ALK1-Fc по сравнению с гомодимером TGFβRII _{SHORT} -Fc и гомодимером ALK1-Fc									
Лиганд	Гомодимер TGFβRII _{SHORT} -Fc			Гомодимер ALK1-Fc			Гетеродимер TGFβRII _{SHORT} -Fc:ALK1-Fc		
	K _a (1/Мс)	K _d (1/с)	K _D (пМ)	K _a (1/Мс)	K _d (1/с)	K _D (пМ)	K _a (1/Мс)	K _d (1/с)	K _D (пМ)
ВМР9	Нет связывания			7,9×10 ⁶	1,3×10 ⁻⁴	16	2,1×10 ⁷	2,2×10 ⁻³	110
ВМР10	Нет связывания			1,7×10 ⁷	1,1×10 ⁻⁴	6	1,2×10 ⁷	9,6×10 ⁻⁴	78
TGFβ1	4,2×10 ⁷	1,1×10 ⁻³	25	Нет связывания			Временное*		>5300
TGFβ2	Временное*		>44000	Нет связывания			Нет связывания		
TGFβ3	5,9×10 ⁷	5,9×10 ⁻³	99	Нет связывания			Временное*		>4700

* Не определено вследствие временной природы взаимодействия

Пример 26. Получение гетеродимера TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc, содержащий внеклеточные домены короткой (канонической) изоформы TGFβRII человека и ALK5 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид TGFβRII_{SHORT}-Fc и слитый полипептид ALK5-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них представлены в настоящем описании.

Образованию гетеродимерного TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия. Последовательность слитого полипептида TGFβRII_{SHORT}-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 24 в качестве SEQ ID NO: 127-129. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано в примере 24. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 127 и 129 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидная последовательность комплементарного слитого полипептида ALK5-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 11 в качестве SEQ ID NO: 139-141. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом TGFβRII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 127 и 129 в Fc-домен слитого полипептида ALK5-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано в примере 11. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 139 и 141 необязательно могут быть предоставлены с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды TGFβRII_{SHORT}-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 415-416) рассмотрены в примере 24. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен полипептида TGFβRII_{SHORT}-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано в примере 24. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 415-416 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидные последовательности комплементарного слитого полипептида ALK5-Fc (SEQ ID NO: 423-424) рассмотрены в примере 11. Для способствования образованию гетеродимера слитым поли-

пептидом TGFβRII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 415-416 в Fc-домен слитого полипептида ALK5 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано в примере 11. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 423-424 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды TGFβRII_{SHORT}-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 416 и SEQ ID NO: 424, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc.

Очистка различных комплексов TGFβRII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 27. Получение гетеродимера TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc.

Заявители сконструировали растворимый гетеромерный комплекс TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc, содержащий внеклеточный домен длинной изоформы (А) TGFβRII человека и внеклеточный домен ALK5 человека, каждый из которых отдельно слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид TGFβRII_{LONG}-Fc и слитый полипептид ALK5-Fc, соответственно, и последовательности для каждого из них представлены в настоящем описании.

Образованию гетеродимерного TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия. Последовательность слитого полипептида TGFβRII_{LONG}-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 24 в качестве SEQ ID NO: 130-132. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого TGFβRII_{LONG}-Fc белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано в примере 24. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 130 и 132 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидная последовательность комплементарного слитого полипептида ALK5-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 11 в качестве SEQ ID NO: 139-141. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом TGFβRII_{LONG}-Fc SEQ ID NO: 130 и 132 в Fc-домен слитого полипептида ALK5-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано в примере 11. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 139 и 142 необязательно могут быть предоставлены с добавленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды TGFβRII_{LONG}-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 141, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGFβRII_{LONG}-Fc :ALK5-Fc.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Последовательности слитого полипептида TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 417-418) рассмотрены в примере 24. Для способствования образованию гетеродимера TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен полипептида TGFβRII_{LONG}-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано в примере 24. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 417-418 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Полипептидные последовательности комплементарного слитого полипептида ALK5-Fc (SEQ ID NO: 423-424) рассмотрены в примере 11. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом TGFβRII_{LONG}-Fc SEQ ID NO: 417-418 в Fc-домен слитого полипептида ALK5 может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано в примере 11. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 423-424 необязательно могут быть предоставлены с удаленным остатком лизина на С-конце.

Слитые полипептиды TGFβRII_{LONG}-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 418 и SEQ ID NO: 424, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc.

Очистка различных комплексов TGFβRII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 28. Профили активности гетеродимеров TGF β RII-Fc:ALK5-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK5-Fc.

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для сравнения селективности связывания лиганда гетеродимерными комплексами TGF β RII_{SHORT}-Fc:ALK5-Fc и TGF β RII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc, описанными в примерах 26-27 с гомодимерными комплексами TGF β RII_{SHORT}-Fc и ALK5-Fc. Гетеродимерные или гомодимерные белковые комплексы независимо улавливали на системе с использованием антитела против Fc. Инжектировали лиганды, и им позволяли протекать над уловленным белком рецептора. Результаты обобщенно представлены в таблице ниже, в которой скорости диссоциации лиганда (k_d), указывающие на наиболее эффективные ловушки лигандов, обозначены серым затенением.

Профиль связывания лигандаов гетеродимерами TGF β RII-Fc:ALK5-Fc по сравнению с гомодимером TGF β RII-Fc и гомодимером ALK5-Fc												
Лига нд	Гомодиме р ALK5- Fc			Гомодимер TGF β RII _{SHORT} -Fc			Гетеродимер TGF β RII _{SHORT} - Fc:ALK5-Fc*			Гетеродимер TGF β RII _{LONG} -Fc:ALK5- Fc *		
	k_a	k_d	K_D	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (пМ)	k_a (1/М с)	k_d (1/с)	K_D (пМ)
TGF β 1	Нет связыван ия			5,6×1 0 ⁷	1,1×1 0 ⁻³	20	1,4×1 0 ⁸	1,7×1 0 ⁻³	12	6,6×1 0 ⁷	9,2×1 0 ⁻⁴	14
TGF β 2	Нет			2,1×1	2,2×1	1100	6,6×1	2,9×1	0,4	4,2×1	2,8×1	0,07
	связыван ия			0 ⁵	0 ⁻³	0	0 ⁶	0 ⁻⁶		0 ⁶	0 ⁻⁷	
TGF β 3	Нет связыван ия			1,9×1 0 ⁷	1,4×1 0 ⁻³	71	2,7×1 0 ⁷	1,0×1 0 ⁻³	38	2,7×1 0 ⁷	1,0×1 0 ⁻³	38
* Низкий сигнал, который указывает на то, что значительная часть белка неактивна												

Эти сравнительные данные о связывании указывают на то, что профили связывания лигандов гетеродимерами TGF β RII-Fc:ALK5-Fc значительно отличаются от гомодимера ActRIIB-Fc и от гомодимера ALK5-Fc, которые не связывали никаких лигандов. Исходя из равновесной константы диссоциации (K_D), гомодимер ActRIIB-Fc связывал TGF β 1 и TGF β 3 со значительно более высокой аффинностью, чем TGF β 2, даже несмотря на то, что скорость диссоциации для этих трех лигандов TGF β была сходной. Напротив, гетеродимеры TGF β RII-Fc: ALK5-Fc продемонстрировали высокую селективность в отношении TGF β 2 относительно TGF β 1/TGF β 3. В частности, гетеродимер TGF β RII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc связывал TGF β 2 с аффинностью, приблизительно на пять порядков величины превышающей, и со скоростью диссоциации, приблизительно на четыре порядка величины более медленной, чем гомодимер ActRIIB-Fc. Гетеродимер TGF β RII_{LONG}-Fc:ALK5-Fc также связывал TGF β 2 прочнее, чем гетеродимер, содержащий короткую изоформу. См. фиг. 14. Ни один из гетеродимеров TGF β RII-Fc:ALK5-Fc не был способен связывать BMP9 или BMP10 (данные не представлены), что отличает эти гетеродимеры TGF β RII-Fc: ALK5-Fc от гетеродимера TGF β RII-Fc: ALK1-Fc (см. пример 25). Сенсограммы для двух гетеродимеров TGF β RII-Fc:ALK5-Fc продемонстрировали низкую амплитуду сигнала, что указывает на то, что значительная часть каждого белка была неактивной.

Чтобы лучше интерпретировать эти данные, полученные посредством поверхностного плазмонного резонанса, использовали анализ с репортерным геном в клетках A549 использовали для определения способности слитых белков TGF β RII ингибировать активность TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3. Этот анализ основан на клеточной линии карциномы легкого человека, трансфицированной репортерными плазмидами pGL3(CAGA)12-люцифераза светлячка (Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100) и pRLCMV-люцифераза genilla, последняя для контроля эффективности трансфекции. В промоторах отвечающих на TGF β генов (например, PAI-1) присутствует мотив CAGA, так что этот вектор обычно используют для факторов, передающих сигнал через SMAD2 и SMAD3.

В первый день анализа клетки A549 (ATCC®: CCL-185™) распределяли в 48-луночные планшеты в количестве 6,5×10⁴ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Во всех случаях инкубацию проводили при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе для культивирования тканей, если нет иных указаний. На второй день раствор, содержащий 10 мкг pGL3(CAGA)12-люцифераза светлячка, 100 нг pRLCMV-люцифераза genilla, 30 мкл x-tremeGENE 9 (Roche Applied Science) и 970 мкл OptiMEM (Invitrogen) предварительно инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли к 24 мл минимальной эс-

сенциальной среды Игла (EMEM, ATCC®), дополненной 0,1% BSA. Среду удаляли из лунок планшета и эту смесь для трансфекции добавляли к клеткам (500 мкл/лунка) на протяжении инкубации в течение ночи. На третий день среду удаляли и клетки инкубировали в течение ночи со смесью лигандов и ингибиторов, полученных, как описано ниже.

Серийные разведения исследуемых соединений получали в 48-луночном планшете в 200 мкл буфера для анализа (EMEM+0,1% BSA). Добавляли равный объем буфера для анализа, содержащий исследуемый лиганд, с получением конечной концентрации лиганда, равной EC_{50} , определенной ранее. TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 человека получали от PerproTech. Исследуемые растворы инкубировали в течение 30 минут, затем к трансфицированным клеткам добавляли 250 мкл смеси. Каждую концентрацию исследуемого соединения определяли в двух экземплярах. После инкубации с исследуемыми растворами в течение ночи клетки ополаскивали фосфатно-солевым буфером, затем лизировали пассивным лизирующим буфером (Promega E1941) и хранили в течение ночи при $-70^{\circ}C$. На четвертый и последний день планшеты нагревали до комнатной температуры при осторожном качании. Клеточные лизаты переносили в хемилюминесцентный планшет (96-луночный) и анализировали в люцинометре с реагентами из системы Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega E1980) для определения нормализованной активности люциферазы.

Этот анализ использовали для сравнения способности вариантов слитого белка TGF β RII ингибировать клеточную передачу сигнала посредством лигандов TGF β RII. Результаты представлены в таблице ниже.

Ингибиторная активность слитых белков TGF β RII в клетках A549			
Конструкция	IC ₅₀ (пМ)		
	TGF β 1 (640 пг/мл)	TGF β 2 (480 пг/мл)	TGF β 3 (270 пг/мл)
Гомодимер TGF β RII _{SHORT} -Fc	90	---	9
Гетеродимер TGF β RII _{SHORT} -Fc:ALK5-Fc*	< 350*	~ 200*	< 90*
Гетеродимер TGF β RII _{LONG} -Fc:ALK5-Fc	204	154	35
--- Нет ингибирования (протестировано в концентрациях вплоть до 10 нМ)			
* Величина является неточной вследствие диапазона исследованных концентраций			

Результаты для гомодимера ActRIIB-Fc соответствовали предшествующим сообщениям, касающимся гомодимеров TGF β RII_{SHORT}-Fc и TGF β RII_{LONG}-Fc (del Re et al., J. Biol. Chem 279:22765, 2004). В этом эксперименте гомодимер TGF β RII_{SHORT}-Fc эффективно ингибировал TGF β 1 и TGF β 3, но был не способен ингибировать TGF β 2 при концентрациях гомодимера вплоть до 10 нМ. Эти данные согласуются с низкой аффинностью связывания TGF β 2 с гомодимером ActRIIB-Fc, но, что странно, не согласуются с его медленной константой диссоциации (см. результаты связывания выше). Напротив, гетеродимеры TGF β RII-Fc:ALK5-Fc эффективно ингибировали все три лиганда TGF β в клеточной среде. Следовательно, гетеродимер TGF β RII-Fc:ALK5-Fc неожиданно будет полезным в определенных терапевтических применениях, где является преимущественным предпочтительный антагонизм TGF β 2 или комбинированный антагонизм TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3.

Пример 29. Получение гетеродимеров MISRII-Fc:ALK3-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс MISRII-Fc:ALK3-Fc, содержащий внеклеточные домены MISRII человека и ALK3 человека, каждый из которых можно по отдельности подвергать слиянию с Fc-доменом с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитый полипептид MISRII-Fc и слитый полипептид ALK3-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного MISRII-Fc:ALK3-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. В первом подходе один Fc-домен изменяют внесением катионных аминокислот на поверхность взаимодействия, в то время как другой Fc-домен изменяют внесением анионных аминокислот на поверхность взаимодействия.

Последовательность полипептида MISRII-Fc (SEQ ID NO: 133) показана ниже:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAPPNRRT CVFFEAPGVR GSTKTLGELL
51 DTGTELPRAI RCLYSRCCFG IWNLTDRAQ VEMQGCGRDSD EPGCESLHCD
101 PSPRAHPSPG STLFTCSGT DFCNANYSHL PPPGSPGTPG SQGPQAAPGE
151 SIWMALTGGG THTCPAPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
201 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
251 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRKEMTKNQ
301 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
351 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SPSGK (SEQ ID NO: 133)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера MISRII-Fc:ALK3-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка MISRII может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты лизином), как указано двойным подчеркиванием выше.

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 133 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Зрелый слитый полипептид MISRII-Fc (SEQ ID NO: 135) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 PPNRRTCVFF EAPGVRGSK TLGELLDTGT ELPRAIRCLY SRCCFGIWNL
51 TDRAQVEMQ GCRDSEPGC ESLHCDPSR AHPSPGSTLF TCSCGTDFCN
101 ANYSHLPPPG SPGTPGSQGP QAAPGESIWM ALTGGGTHTC PPCPAPELLG
151 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
201 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAIEKTI
251 SKAKGQPREP QVYTLPPSRK EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
301 PENNYKTTPP VLKSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY
351 TQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 135)

```

В этом первом подходе полипептидная последовательность комплементарного слитого белка ALK3-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 4 в качестве SEQ ID NO: 115-117.

Белки MISRII-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 135 и SEQ ID NO: 117, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего MISRII-Fc:ALK3-Fc. Сходные гетеромерные комплексы можно получать путем образования пар белка ALK3-Fc, описанного выше (SEQ ID NO: 117), со слитым белком Fc, содержащим внеклеточный домен MISRII изоформы 2 или внеклеточный домен MISRII изоформы 3 вместо внеклеточного домена MISRII изоформы 1.

Во втором подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены можно изменять внесением комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи.

Последовательность полипептида MISRII-Fc (SEQ ID NO: 419) представлена ниже:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAPPNRRT CVFFEAPGVR GSTKTLGELL
51 DTGTELPRAI RCLYSRCCFG IWNLTDRAQ VEMQGCGRDSD EPGCESLHCD
101 PSPRAHPSPG STLFTCSGT DFCNANYSHL PPPGSPGTPG SQGPQAAPGE
151 SIWMALTGGG THTCPAPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
201 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
251 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PCREEMTKNQ
301 VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
351 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SPSGK
(SEQ ID NO: 419)

```

Лидерная последовательность и линкерная последовательность подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера MISRII-Fc:ALK3-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 419 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Зрелый слитый полипептид MISRII-Fc (SEQ ID NO: 420) является следующим и необязательно может быть предоставлен с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 PPNRRTCFFV EAPGVRGSK TLGELLDTGT ELPRAIRCLY SRCCFGIWNL
51 TQDRAQVEMQ GCRDSDEPGC ESLHCDPSPR AHPSPGSTLF TCSCGTDFCN
101 ANYSHLPPPG SPGTPGSQGP QAAPGESIWM ALTGGGTHTC PPCPAPELLG
151 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
201 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
251 SKAKGQPREP QVYTLPPCRE EMTKNQVSLW CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
301 PENNYKTTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY
351 TQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 420)

```

В этом втором подходе полипептидная последовательность комплементарного слитого белка ALK3-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 4 в качестве SEQ ID NO: 407-408.

Белки MISRII-Fc и ALK3-Fc белки SEQ ID NO: 420 и SEQ ID NO: 408, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего MISRII-Fc:ALK3-Fc. Сходные гетеромерные комплексы можно получать путем образования пары между белком ALK3-Fc, описанного выше (SEQ ID NO: 408), и слитым с Fc белком, содержащим внеклеточный домен изоформы 2 MISRII или внеклеточный домен изоформы 3 MISRII вместо внеклеточного домена изоформы 1 MISRII, описанного выше.

Очистка различных комплексов MISRII-Fc:ALK3-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колонной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 30. Получение гетеродимера ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIA человека и ActRIIB человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIA-Fc и ActRIIB-Fc слитые белки соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 118-120.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 153) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей:

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPP
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 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 153)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 153 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ActRIIB-Fc является следующей (SEQ ID NO: 154) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

```

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 REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYDTT PPVLDSGGSF
301 FLYSDLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK

```

(SEQ ID NO: 154)

Слитые белки ActRIIA-Fc и ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 154, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе оба внеклеточных домена рецепторов связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере в альтернативной полипептидной последовательности слитого белка ActRIIA-Fc (SEQ ID NO: 151) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей.

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAILGRS ETQECLFFNA NWEKDRNTQT
51 GVEPCYGDKD KRRHCFATWK NISGSIEIVK QGCWLDINC YDRDTCVEKK
101 DSPEVYFCCC EGNMCNEKFS YFPEMEVTQP TSNPVTPKPP TGGGTHTCPP
151 CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
201 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
251 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
301 VEWESNGQPE NNYDTTPPVL DSDGSFFLYS DLTVDKSRWQ QGNVFSVSV
351 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 151)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc- домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 151 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ActRIIA-Fc является следующей (SEQ ID NO: 152) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
51 IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPPEM
101 EVTQPTSNPV TPKPPTGGGT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
151 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
201 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
251 SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYDT TPPVLDSGGS
301 FFLYSDLTV D KSRWQQGNV F SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

```

(SEQ ID NO: 152)

Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 100-102.

Слитые белки ActRIIA-Fc и ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 102, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 409-410.

Комплементарная форма слитого полипептида ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 453) является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELEERTNQS
 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 NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 453)

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIA-Fc SEQ ID NO: 409-410 в Fc-домен слитого полипептида ActRIIB-Fc может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 453 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 454) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

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 GPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301 FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK
 (SEQ ID NO: 454)

Белки ActRIIA-Fc и ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 454, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано выше. Однако внеклеточные домены рецепторов в этом подходе связаны с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере в альтернативной полипептидной последовательности слитого белка ActRIIA-Fc (SEQ ID NO: 451) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей.

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAILGRS ETQCECLFFNA NWEKDRTNQT
 51 GVEPCYGDKD KRRHCFATWK NISGSIEIVK QGCWLDDINC YDRDTCVEKK
 101 DSPEVYFCCC EGNMCNEKFS YFPMEVTPQ TSNPVTPKPP TGGGTHTCPP
 151 CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
 201 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
 251 PAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA
 301 VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM
 351 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 451)

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 401-402 в Fc-домен слитого полипептида ActRIIA-Fc может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 451 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ActRIIA-Fc является следующей (SEQ ID NO: 452) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
51 IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
101 EVTQPTSNPV TPKPPTGGGT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
151 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
201 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPP
251 SREEMTKNQV SLSCAVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS
301 FFLVSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 452)

```

Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIB-Fc представлена в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 401-402.

Белки ActRIIA-Fc и ActRIIB-Fc SEQ ID NO: 452 и SEQ ID NO: 402, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIA-Fc:ActRIIB-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 31. Получение гетеродимера ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIA человека и VMPRII человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитые белки ActRIIA-Fc и VMPRII-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 30.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 118-120.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка VMPRII-Fc (SEQ ID NO: 155) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASQNQER LCAFKDPYQQ DLGIGESRIS
51 HENGTILCSK GSTCYGLWEK SKGDINLVKQ GCWSHIGDPQ ECHYECCVVT
101 TTPPSIQNGT YRFCCSTDLD CNVNFTENFP PPDTPPLSPP HSFNRDETGG
151 GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
201 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
251 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
301 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN
351 VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 155)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 155 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Последовательность зрелого слитого белка VMPRII-Fc является следующей (SEQ ID NO: 156) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

```

1 SQNQERLCAF KDPYQQDLGI GESRISHENG TILCSKGSTC YGLWEKSKGD
51 INLVKQGCWS HIGDPQECHY EECVVTTPP SIQNGTYRFC CCSTDLCNVN
101 FTENFPPPD TPLSPPHSFN RDETTGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
251 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP
301 PVLDSGDSFF LYSDLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
351 GK (SEQ ID NO: 156)

```

Слитые белки ActRIIA-Fc и VMPRII-Fc SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 156, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса,

содержащего ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе, внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 151-152.

Полипептидная последовательность слитого белка VMPRII-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 121-123.

Слитые белки ActRIIA-Fc и VMPRII-Fc SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 123, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 409-410.

Комплементарная форма слитого полипептида VMPRII-Fc (SEQ ID NO: 455) является следующей:

```
1 MDMAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASQNQER LCAFKDPYQQ DLGIGESRIS
51 HENGTILCSK GSTCYGLWEK SKGDINLVKQ GCWSHIGDPQ ECHYECCVVT
101 TTPPSIQNGT YRFCCSTDL CNVNFTENFP PDDTTPLSPP HSFNRDETTGG
151 GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
201 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
251 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG
301 FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN
351 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 455)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIA-Fc SEQ ID NO: 409-410 в Fc-домен слитого полипептида VMPRII-Fc может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 455 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Последовательность зрелого слитого белка VMPRII-Fc (SEQ ID NO: 456) является следующей, и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

```
1 SQNQLERLCAF KDPYQQDLGI GESRISHENG TILCSKGSTC YGLWEKSKGD
51 INLVKQGCWS HIGDPQECHY EECVVTTTPP SIQNGTYRFC CCSTDLCNVN
101 FTENFPPDPT TPLSPPHSFN RDETGGGHTT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
251 PQVCTLPSPR EEMTKNQVSL SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP
301 PVLDSGSGFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
351 GK (SEQ ID NO: 456)
```

Белки ActRIIA-Fc и VMPRII-Fc SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 456, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 451-452.

Полипептидная последовательность слитого белка VMPRII-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 411-412.

Белки ActRIIA-Fc и VMPRII-Fc SEQ ID NO: 452 и SEQ ID NO: 412, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIA-Fc:VMPRII-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом по-

рядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 32. Получение гетеродимера ActRIIA-Fc:MISRII-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ActRIIA-Fc:MISRII-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIA человека и MISRII человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ActRIIA-Fc и MISRII-Fc слитые белки соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIA-Fc:MISRII-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 30.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитый белок ActRIIA-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 118-120.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка MISRII-Fc (SEQ ID NO: 161) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей:

```
1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAPPNRRT CVFFEAPGVR GSTKTLGELL
51 DTGTELPRAI RCLYSRCCFG IWNLTDRAQ VEMQGRDSD EPGCESLHCD
101 PSPRAHPSPG STLFCTSCGT DFCNANYSHL PPPGSPGTPG SQGPQAAPGE
151 SIWMALTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
201 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
251 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ
301 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPPVLDSGD SFFLYSDLTV
351 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SPSGK (SEQ ID NO: 161)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимеру ActRIIA-Fc:MISRII-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 161 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка MISRII-Fc является следующей (SEQ ID NO: 162) и обязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```
1 PPNRRTCVFF EAPGVRGSK TLGELLDGT ELPAIRCLY SRCCFGIWNL
51 TQDRAQVEMQ GCRDSEPGC ESLHCDPSR AHPSPGSTLF TCSCGTDFCN
101 ANYSHLPPPG SPGTPGSQGF QAAPGESIWM ALTGGGTHTC PPCPAPELLG
151 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
201 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
251 SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
301 PENNYDTTPP VLDSGDSFFL YSDLTVDKSR WQQGNVFSK VMHEALHNHY
351 TQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 162)
```

Слитые белки ActRIIA-Fc и MISRII-Fc SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 162, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:MISRII-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе рецептор внеклеточный домены связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 151 и 152.

Полипептидная последовательность слитого белка MISRII-Fc представлена в примере 29 в качестве SEQ ID NO: 133 и 135.

Слитые белки ActRIIA-Fc и MISRII-Fc SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 135, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:MISRII-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 409-

410.

Комплементарная форма слитого полипептида MISRII-Fc (SEQ ID NO: 457) является следующей:

```
1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAPPNRR CVFFEAPGVR GSTKTLGELL
51 DTGTELPRAI RCLYSRCCFG IWNLTDRAQ VEMQGRDSD EPGCESLHCD
101 PSPRAHPSPG STLFTCS CGT DFCNANYSHL PPPGSPGTPG SQGPQAAPGE
151 SIWMALTGGG THTCPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
201 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
251 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ
301 VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSG SFFLYSKLTV
351 DKSRWQQGNV FSCVMHEAL HNHYTKSLS LSPGK
(SEQ ID NO: 457)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIA-Fc SEQ ID NO: 409-410 в Fc-домен слитого полипептида MISRII-Fc может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 457 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Последовательность зрелого слитого белка MISRII-Fc (SEQ ID NO: 458) является следующей и обязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

```
1 PPNRRTCVFF EAPGVRGSK TLGELLDTGT ELPRAIRCLY SRCCFGIWNL
51 TQDRAQVEMQ GCRDSDDEPGC ESLHCDPSPR AHPSPGSTLF TCSCGTDFCN
101 ANYSHLPPPG SPGTPGSQGP QAAPGESIWM ALTGGGTHTC PPCPAPELLG
151 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
201 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAIEKTI
251 SKAKGQPREP QVCTLPPSRE EMTKNQVLSL CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ
301 PENNYKTPP VLDSGSEFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
351 TQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 458)
```

Белки ActRIIA-Fc и MISRII-Fc SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 458, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:MISRII-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 451-452.

Полипептидная последовательность слитого белка MISRII-Fc представлена в примере 29 в качестве SEQ ID NO: 419-420.

Белки ActRIIA-Fc и MISRII-Fc SEQ ID NO: 452 и SEQ ID NO: 420, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:MISRII-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIA-Fc:MISRII-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 33. Получение гетеродимера ActRIIA-Fc: TGFβRII_{SHORT}-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ActRIIA-Fc:TGFβRII_{SHORT}-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIA человека и TGFβRII_{SHORT} человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитые белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{SHORT}-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIA-Fc:TGFβRII_{SHORT}-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 30.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 118-120.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID

NO: 157) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей:

```
1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51 QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITLE
101 TVCHDPKLPY HDFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEYNTSNP DTGGGTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP
201 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT
251 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
301 MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYDTTPPV LDSDGSFFLY
351 SDLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
```

(SEQ ID NO: 157)

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc: TGFβRII_{SHORT}-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше.

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 157 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Последовательность зрелого слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc является следующей (SEQ ID NO: 158) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

```
1 TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51 ITSICEKPQE VCAVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCSCSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPDTGG GTHTCPPCPA
151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
251 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
301 ENSGQPENNY DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
351 LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 158)
```

Слитые белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{short}-Fc SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 158, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:TGFβRII_{short}-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 151-152.

Полипептидная последовательность слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 24 в качестве SEQ ID NO: 127-129.

Слитые белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 129, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:TGFβRII_{SHORT}-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 409-410.

Комплементарная форма слитого полипептида TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 459) является следующей:

```
1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP
51 QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVAVW RKNDENITLE
101 TVCHDPKLPY HDFILEDAAS PKCIMKEKKK PGETFFMCSC SSDECNDNII
151 FSEYNTSNP DTGGGTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP
201 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT
251 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VCTTLPPSREE
301 MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY
351 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
```

(SEQ ID NO: 459)

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIA-Fc SEQ ID NO: 409-410 в Fc-домен слитого полипептида

TGFβRII_{SHORT}-Fc может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 459 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc (SEQ ID NO: 460) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1  TTPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51  ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCSSEDE CNDNIIFSEE YNTSNPDTGG GTHTCPPCPA
151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
251 IEKTISKAKG QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW
301 ESNQQPENNY KTPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
351 LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 460)

```

Белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 460, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:TGFβRII_{SHORT}-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 451-452.

Полипептидная последовательность слитого белка TGFβRII_{SHORT}-Fc представлена в примере 24 в качестве SEQ ID NO: 415-416.

Белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{SHORT}-Fc SEQ ID NO: 452 и SEQ ID NO: 416, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:TGFβRII_{SHORT}-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIA-Fc:TGFβRII_{SHORT}-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 34. Получение гетеродимера ActRIIA-Fc: TGFβRII_{LONG}-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ActRIIA-Fc:TGFβRII_{LONG}-Fc, содержащий внеклеточные домены ActRIIA человека и TGFβRII_{LONG} человека, каждый из которых слит с Fc- доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитые белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{LONG}-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ActRIIA-Fc:TGFβRII_{LONG}-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 30.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 118-120.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 159) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей:

```

1  MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
51  RTAHPRLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
101 TSICEKPQEV CVAVWRKND NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
151 KEKKKPGETF FMCSSSEDE CNDNIIFSEY NTSNPDTGGG THTCPPCPAP
201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKN VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
351 SNGQPENNYD TTPPVLDSDG SFFLYSDLTV DKSRRWQQGNV FSCSVMHEAL
401 HNHYTQKSL SPSGK (SEQ ID NO: 159)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ActRIIA-Fc:TGFβRII_{LONG}-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-

домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих остатки лизина остатками аспарагиновой кислоты), как указано двойным подчеркиванием выше.

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 159 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка TGFβRII_{LONG}-Fc является следующей (SEQ ID NO: 160) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1  TTPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
51  PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKICMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
151 IFSEEYNTSN PDTGGGTHTC PPCAPELGG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
201 FEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVIN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
251 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE
301 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYDTTPP VLDSGDSFFL
351 YSDLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNH YQKSLSLSPG K
(SEQ ID NO: 160)

```

Слитые белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{LONG}-Fc SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 160, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:TGFβRII_{LONG}-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 151-152.

Полипептидная последовательность слитого белка TGFβRII_{LONG}-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 24 в качестве SEQ ID NO: 130-132.

Слитые белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{LONG}-Fc SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 132, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc:TGFβRII_{LONG}-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 14 в качестве SEQ ID NO: 409-410.

Комплементарная форма слитого полипептида TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 461) является следующей:

```

1  MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
51  RTAHLPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
101 TSICEKPQEV CVAVWRKND E NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
151 KEKKKPGETF FMCSCSDEC NDNIIFSEEY NTSNPDTGGG THTCPPCPAP
201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE
351 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
401 HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 461)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ActRIIA-Fc SEQ ID NO: 409-410 в Fc-домен слитого полипептида ActRIIB-Fc может быть внесено четыре аминокислотных замены, как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 461 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка TGFβRII_{LONG}-Fc (SEQ ID NO: 462) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFC DVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEYNTSN PDTGGGTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 201 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 251 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVCTLPPSRE
 301 EMTKNQVSL S CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDS DGSFFL
 351 VSKLTVDKSR WQQGNVFC S VMHEALHNNY TQKSLSLSPG K

(SEQ ID NO: 462)

Белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{LONG}-Fc SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 462, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc: TGFβRII_{LONG}-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ActRIIA-Fc представлена в примере 30 в качестве SEQ ID NO: 451-452.

Полипептидная последовательность слитого белка TGFβRII_{LONG}-Fc представлена в примере 24 в качестве SEQ ID NO: 417-418.

Белки ActRIIA-Fc и TGFβRII_{LONG}-Fc SEQ ID NO: 452 и SEQ ID NO: 418, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ActRIIA-Fc: TGFβRII_{LONG}-Fc.

Очистка различных комплексов ActRIIA-Fc: TGFβRII_{LONG}-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 35. Получение дополнительных гетеродимеров, содержащих два рецептора типа II.

Образованию дополнительных гетеродимерных белковых комплексов, содержащих внеклеточные домены двух рецепторов типа II можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 30. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: для этих вариантов гетеродимеров приведены в таблице ниже, которая для полноты также включает уже рассмотренные гетеродимеры, которые содержат два рецептора типа II (примеры 30-34). Как описано в примерах 30-34, С-концевой остаток лизина каждого слитого белка рецептор-Fc необязательно может быть включен или исключен.

В каждом случае можно получать растворимый гетеромерный комплекс, содержащий внеклеточные домены (ECD) двух различных рецепторов типа II, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. В каждом случае слитые белки можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного белкового комплекса. В каждом случае очистка различных гетеромерных комплексов может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Гетеродимеры рецепторов типа II: типа II

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: для гетеродимеров рецепторов типа II: типа II					
Гетеромерный комплекс слитого белка	Тип пары Fc	Соответствие ECD паре Fc	Слитый белок рецептор-Fc	Аминокислотная последовательность SEQ ID NO	
				С лидерной последовательностью	Зрелая
ActRIIA-Fc: ActRIIB-Fc	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			ActRIIB-Fc	153	154
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			ActRIIB-Fc	100	102
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
		B	ActRIIB-Fc	453	454
			ActRIIA-Fc	451	452
			ActRIIB-Fc	401	402
ActRIIA-Fc: BMPRII-Fc	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			BMPRII-Fc	155	156
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			BMPRII-Fc	121	123
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
		B	BMPRII-Fc	455	456
			ActRIIA-Fc	451	452
			BMPRII-Fc	411	412
ActRIIA-Fc: MISRII-Fc	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			MISRII-Fc	161	162
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			MISRII-Fc	133	135
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
		B	MISRII-Fc	457	458
			ActRIIA-Fc	451	452
			MISRII-Fc	419	420
ActRIIA-Fc: TGFβRII _{SHORT} -Fc	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ActRIIA-Fc	451	452
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
ActRIIA-Fc: TGFβRII _{LONG} -Fc	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
		B	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
			ActRIIA-Fc	451	452
			TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
ActRIIB-Fc: BMPRII-Fc	Электростатическая	A	ActRIIB-Fc	100	102
			BMPRII-Fc	155	156
		B	ActRIIB-Fc	153	154
			BMPRII-Fc	121	123
	Гидрофобная	A	ActRIIB-Fc	401	402

			BMPRII-Fc	455	456
		В	ActRIIB-Fc	453	454
			BMPRII-Fc	411	412
ActRIIB-Fc: MISRII-Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			MISRII-Fc	161	162
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			MISRII-Fc	133	135
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
		В	MISRII-Fc	457	458
ActRIIB-Fc: TGFβRII _{SHORT} - Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
ActRIIB-Fc: TGFβRII _{LONG} - Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
		В	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
BMPRII-Fc: MISRII-Fc	Электроста- тическая	А	BMPRII-Fc	121	123
			MISRII-Fc	161	162
		В	BMPRII-Fc	155	156
			MISRII-Fc	133	135
	Гидрофобная	А	BMPRII-Fc	411	412
		В	MISRII-Fc	457	458
BMPRII-Fc: TGFβRII _{SHORT} - Fc	Электроста- тическая	А	BMPRII-Fc	455	456
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	419	420
BMPRII-Fc: TGFβRII _{SHORT} - Fc	Электроста- тическая	А	BMPRII-Fc	121	123
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			BMPRII-Fc	155	156

	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			BMPRII-Fc	411	412
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			BMPRII-Fc	455	456
BMPRII-Fc: TGFβRII _{LONG} -Fc	Электростатическая	A	BMPRII-Fc	121	123
			TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
		B	BMPRII-Fc	155	156
			TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
	Гидрофобная	A	BMPRII-Fc	411	412
			TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
		B	BMPRII-Fc	455	456
			TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
MISRII-Fc: TGFβRII _{SHORT} -Fc	Электростатическая	A	MISRII-Fc	133	135
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
		B	MISRII-Fc	161	162
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
	Гидрофобная	A	MISRII-Fc	419	420
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
		B	MISRII-Fc	457	458
			TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
MISRII-Fc: TGFβRII _{LONG} -Fc	Электростатическая	A	MISRII-Fc	133	135
			TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
		B	MISRII-Fc	161	162
			TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
	Гидрофобная	A	MISRII-Fc	419	420
			TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
		B	MISRII-Fc	457	458
			TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
TGFβRII _{SHORT} -Fc: TGFβRII _{LONG} -Fc	Электростатическая	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418

Пример 36. Получение гетеродимера ALK1-Fc:ALK2-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ALK1-Fc:ALK2-Fc, содержащий внеклеточный домены ALK1 человека и ALK2 человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ALK1-Fc и ALK2-Fc слитые белки соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK1-Fc:ALK2-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены выше в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ALK2-Fc (SEQ ID NO: 173) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAMEDKPKV NPNKLYMCV CEGLSGCGNED
 51 HCEGQQCFSS LSINDGFHVV QKGCQVYEQ GKMTCKTPPS PGQAVECCQG
 101 DWCNRNITAQ LPTKGSFPG TQNFHLETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPKPKDNL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVYTL PPSRKEMTKN QVSLTCLVKG FYPDSIAVEW ESNQPPENNY
 301 KTTTPVVKSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPG (SEQ ID NO: 173)

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK2-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 173 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK2-Fc является следующей (SEQ ID NO: 174) и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

1 MEDEKPKVNP KLYMCVCEGL SCGNEDHCEG QQCFSSLSIN DGFHVVYQKGC
 51 FQVYEQGKMT CKTPPSPGQA VECCQGDWCN RNITAQLPTK GKSFPPTQNF
 101 HLETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 151 VSHEDPEVKF NNYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR KEMTKNQVSL
 251 TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLKSDGSFF LYSKLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTKLSLSLSP G (SEQ ID NO: 174)

Слитые белки ALK1-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 174, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK2-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе оба внеклеточных домена рецепторов связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере в альтернативной полипептидной последовательности слитого белка ALK1-Fc (SEQ ID NO: 171) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей.

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGADPVKPS RGPLVTCTCE SPHCKGPTCR
 51 GAWCTVVLVR EGRHPQEHR GCGNLHRELK RGRPTFEVNH YCCDHLNCH
 101 NVSLVLEATQ PPSEQPGTDG QLATGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
 151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NNYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 251 PQVYTLPPSR KEMTKNQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTTT
 301 PVLKSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTKLSLSLSP
 351 G (SEQ ID NO: 171)

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK2-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 171 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK1-Fc является следующей (SEQ ID NO: 172) и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

1 DPVKPSRGPL VTCTCESPHK KGPTCRGAWC TVVLVREGR HPQEHRCGN
 51 LHRELRCGRP TEFVNHYCCD SHLCNHNVS LVEATQPPSE QPGTDGQLAT
 101 GGGTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
 151 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 201 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV
 251 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVVK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 301 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG (SEQ ID NO: 172)

Полипептидная последовательность слитого белка ALK2-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 9 в качестве SEQ ID NO: 136-138.

Слитые белки ALK1-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 138, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK2-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 413-414.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK2-Fc (SEQ ID NO: 465) является следующей:

```
1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAMEDKPKV NPNKLYMVCV CEGLSGCGNED
51 HCEGQQCFSS LSINDGFHVY QKGCQVVEEQ GKMTCKTPPS PGQAVECCQG
101 DWCNRNITAQ LPTKKGKSFPG TQNFHLETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVYTL PPREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY
301 KTRPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK (SEQ ID NO: 465)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK1-Fc SEQ ID NO: 413-414 в Fc-домен слитого полипептида ALK2-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 465 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK2-Fc (SEQ ID NO: 466) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```
1 MEDEKPKVNP KLYMVCVEGL SCGNEDHCEG QQCFSSLSIN DGFHVYQKGC
51 FQVVEQKMT CKTPPSGQA VECCQGDWCN RNITAOQLPTK GKSFPQTQNF
101 HLETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR EEMTKNQVSL
251 WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTRP PVLSDSGSFF LYSKLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLSP GK (SEQ ID NO: 466)
```

Белки ALK1-Fc и ALK2-Fc белки SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 466, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK2-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере, в альтернативной полипептидной последовательности слитого белка ALK1-Fc (SEQ ID NO: 463) используется лидерная последовательность TPA, и она является следующей.

```
1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGADPVKPS RGPLVTCTCE SPHCKGPTCR
51 GAWCTVVLVR EEGRHPQHR GCGNLHRELC RGRPTEFVNH YCCDSHLCHN
101 NVSLVLEATQ PPSEQPGTDG QLATGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
151 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
201 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE
251 PQVYTLPPCR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTRP
301 PVLSDSGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLSP
351 GK (SEQ ID NO: 463)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK2-Fc SEQ ID NO: 421-422 в Fc-домен слитого полипептида ALK1-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 463 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK1-Fc является следующей (SEQ ID NO: 464) и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 DPVKPSRGPL VTCTCESPHC KGPTCRGAWC TVVLVREEGR HPQEHRCGN
51 LHRELCRGRP TEFVNHYYCCD SHLCNHNHNSL VLEATQPPSE QPGTDGQLAT
101 GGGTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
151 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
201 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV
251 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
301 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 464)

```

Полипептидная последовательность слитого белка ALK2-Fc представлена в примере 9 в качестве SEQ ID NO: 421-422.

Белки ALK1-Fc и ALK2-Fc SEQ ID NO: 464 и SEQ ID NO: 422, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK2-Fc.

Очистка различных комплексов ALK1-Fc:ALK2-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусом и заменой буфера.

Пример 37. Получение гетеродимера ALK1-Fc:ALK3-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ALK1-Fc:ALK3-Fc, содержащий внеклеточный домены ALK1 человека и ALK3 человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ALK1-Fc и ALK3-Fc слитые белки соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK1-Fc:ALK3-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 36.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ALK3-Fc (SEQ ID NO: 175) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей:

```

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGAQNLD SM LHGTGMKSDS DQKSENGVT
51 LAPEDTL PFL KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCFAIIEED DQGETTLASG
101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG
151 SIRuTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
201 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
251 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR KEMTKNQVSL
301 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLuKSDGSFF LYSKLTVDKS
351 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 175)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK3-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 175 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK3-Fc является следующей (SEQ ID NO: 176) и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

```

1 GAQNLD SMLH GTGMKSDSDQ KSENGVTLA PEDTL PFLKC YCSGHCPDDA
51 INNTCITNGH CFAIIEEDDQ GETTLASGCM KYEGSDFQCK DSPKAQLRRT
101 IECRTNL CN QYLQPTLPPV VIGPFFD GSI RTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKQPREPQ VYTLPPSRKE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTTPV LKSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPG (SEQ ID NO: 176)

```

Слитые белки ALK1-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 176, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK3-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере

альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 171-172.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK3-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 4 в качестве SEQ ID NO: 115-117.

Слитые белки ALK1-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 117, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK3-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 413-414.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK3-Fc (SEQ ID NO: 467) является следующей:

```
1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAQNLDSM LHGTGMKSDS DQKSENGVT
51  LAPEDTLPLF KCYCSGHCPD DAINNTCITN GHCFATIEED DQGETTLASG
101 CMKYEGSDFQ CKDSPKAQLR RTIECCRTNL CNQYLQPTLP PVVIGPFFDG
151 SIRTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
201 VSHEDPEVKF NMYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
251 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR EEMTKNQVSL
301 WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
351 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLSP GK (SEQ ID NO: 467)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK1-Fc SEQ ID NO: 413-414 в Fc-домен слитого полипептида ALK3-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 467 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK3-Fc (SEQ ID NO: 468) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```
1  GAQNLDSMLH GTGMKSDSDQ KSENGVTLA PEDTLPLFLK YCSGHCPDDA
51  INNTCITNGH CFAIIEEDDQ GETTLASGCM KYEGSDFQCK DSPKAQLRRT
101 IECCRTNL CN QYLQPTLPPV VIGPFFD GSI RTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPCREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTPPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT
351 QKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 468)
```

Белки ALK1-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 468, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK3-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 463-464.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK3-Fc представлена в примере 4 в качестве SEQ ID NO: 407-408.

Белки ALK1-Fc и ALK3-Fc SEQ ID NO: 464 и SEQ ID NO: 408, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK3-Fc.

Очистка различных комплексов ALK1-Fc:ALK3-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 38. Получение гетеродимера ALK1-Fc:ALK4-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ALK1-Fc :ALK4-Fc, содержащий внеклеточные домены ALK1 человека и ALK4 человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером,

расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитые белки ALK1-Fc и ALK4-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK1-Fc:ALK4-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 36.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ALK4-Fc (SEQ ID NO: 177) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей:

```
1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51 GACMVSIFNL DGMENHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSSED LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVE TGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVYTL PPSR KEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY
301 KTTTPVLKSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPG (SEQ ID NO: 177)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK4-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 177 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK4-Fc является следующей (SEQ ID NO: 178) и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

```
1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR KEMTKNQVSL
251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLKSDGSFF LYSKLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 178)
```

Слитые белки ALK1-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 178, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK4-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 171-172.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK4-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 104-106.

Слитые белки ALK1-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 106, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK4-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 413-414.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK4-Fc (SEQ ID NO: 469) является следующей:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51 GACMVSIFNL DGMHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSSED LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVYTL PPCREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNQOPENNY
301 KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK (SEQ ID NO: 469)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK1-Fc SEQ ID NO: 413-414 в Fc-домен слитого полипептида ALK4-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном) как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 469 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK4-Fc (SEQ ID NO: 470) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIENLDGME HHVRTCIPKV
51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NRYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR EEMTKNQVSL
251 WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 470)

```

Белки ALK1-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 470, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK4-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 463-464.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK4-Fc представлена в примере 1 в качестве SEQ ID NO: 403-404.

Белки ALK1-Fc и ALK4-Fc SEQ ID NO: 464 и SEQ ID NO: 404, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK4-Fc.

Очистка различных комплексов ALK1-Fc:ALK4-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колонной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзивная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 39. Получение гетеродимера ALK1-Fc:ALK5-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ALK1-Fc:ALK5-Fc, содержащий внеклеточные домены ALK1 человека и ALK5 человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как ALK1-Fc и ALK5-Fc слитые белки соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK1-Fc:ALK5-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 36.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ALK5-Fc (SEQ ID NO: 179) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAALLPGA TALQCFCHLC TKDNFTCVTD
51 GLCFVSVTET TDKVIHNSMC IAEIDLIPRD RPFVCPASSK TGSVTTTYCC
101 NQDHCNKIEL PTTVKSSPGL GPVETGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
151 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
201 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
251 EPQVYTLPPS RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
301 PPVLKSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
351 PG (SEQ ID NO: 179)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK5-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 179 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK5-Fc является следующей (SEQ ID NO: 180) и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

```

1 ALLPGATALQ CFCHLCTKDN FTCVTDGLCF VSVTETTDKV IHNSMCIAEI
51 DLIPRDRPFV CAPSSKTGSV TTYCCNQDH CNKIELPTTV KSSPGLGPVE
101 TGGGHTNTPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPV VTCVVVDVSH
151 EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
201 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRKEM TKNQVSLTCL
251 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL KSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
301 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO: 180)

```

Слитые белки ALK1-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 180, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK5-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 171-172.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK5-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 11 в качестве SEQ ID NO: 139-141.

Слитые белки ALK1-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 141, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK5-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 413-414.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK5-Fc (SEQ ID NO: 471) является следующей:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAALLPGA TALQCFCHLC TKDNFTCVTD
51 GLCFVSVTET TDKVIHNSMC IAEIDLIPRD RPFVCPASSK TGSVTTTYCC
101 NQDHCNKIEL PTTVKSSPGL GPVETGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
151 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
201 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
251 EPQVYTLPPC REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
301 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
351 PGK (SEQ ID NO: 471)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK1-Fc SEQ ID NO: 413-414 в Fc-домен слитого полипептида ALK5-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серии цистеином и треонин триптофаном) как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 471 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK5-Fc (SEQ ID NO: 472) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```

1 ALLPGATALQ CFCHLCTKDN FTCVTDGLCF VSVTETTDKV IHNSMCIAEI
51 DLIPDRPFV CAPSSKTGSV TTTYCCNQDH CNKIELPTTV KSSPGLGPVE
101 TGGGTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
151 EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
201 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCREEM TKNQVSLWCL
251 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
301 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 472)

```

Белки ALK1-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 472, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK5-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 463-464.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK5-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 423-424.

Белки ALK1-Fc и ALK5-Fc SEQ ID NO: 464 и SEQ ID NO: 424, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK5-Fc.

Очистка различных комплексов ALK1-Fc:ALK5-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 40. Получение гетеродимера ALK1-Fc:ALK6-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ALK1-Fc:ALK6-Fc, содержащий внеклеточные домены ALK1 человека и ALK6 человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитые белки ALK1-Fc и ALK6-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK1-Fc:ALK6-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 36.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ALK6-Fc (SEQ ID NO: 181) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAKKEDGE STAPTTPRKV LRCKCHNHCP
51 EDSVNNICST DGYCFMIEE DDSGLPVVTS GCLGLEGSDF QCRDTPIPHQ
101 RRSIECCTER NECNKDLHPT LPPLKNRDFV DGPIHHRTGG GTHTCPPCPA
151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP
251 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRKEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
301 ESNGQPENNY KTTTPVLKSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
351 LHNHYTQKSL SLSPG (SEQ ID NO: 181)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK6-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 181 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK6-Fc является следующей (SEQ ID NO: 182) и необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

```

1 KKEDGESTAP TPRPKVLRCK CHHHCPEDSV NNICSTDGYC FTMIEEDDSG
51 LPVVTSGCLG LEGSDFQCRD TPIPHQRRSI ECCTERNECN KDLHPTLPPL
101 KNRDFVDGPI HHRTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
251 KEMTKNQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLKSDGSFF
301 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G

```

(SEQ ID NO: 182)

Слитые белки ALK1-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 182, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK6-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 171-172.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK6-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 13 в качестве SEQ ID NO: 142-144.

Слитые белки ALK1-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 144, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK6-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 413-414.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK6-Fc (SEQ ID NO: 473) является следующей:

```

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGAKKEDGE STAPTuPRPKV LRCKCHHHCuP
51 EDSVNNICST DGYCFTMIEE DDSGLPVVTS GCLGLEGSDF QCRDTPIPHQ
101 RRSIECCTER NECNKDLHPT LPPLKNRDFV DGPIHHRTGG GTHTCPPCPA
151 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
201 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
251 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPCREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW
301 ESNQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
351 LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 473)

```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK1-Fc SEQ ID NO: 413-414 в Fc-домен слитого полипептида ALK6-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 473 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

Последовательность зрелого слитого белка ALK6-Fc (SEQ ID NO: 474) является следующей и необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на C-конце.

```

1 KKEDGESTAP TPRPKVLRCK CHHHCPEDSV NNICSTDGYC FTMIEEDDSG
51 LPVVTSGCLG LEGSDFQCRD TPIPHQRRSI ECCTERNECN KDLHPTLPPL
101 KNRDFVDGPI HHRTGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR
251 EEMTKNQVSL WCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF
301 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK

```

(SEQ ID NO: 474)

Белки ALK1-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 474, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK6-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противополож-

ным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 463-464.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK6-Fc представлена в примере 13 в качестве SEQ ID NO: 425-426.

Белки ALK1-Fc и ALK6-Fc SEQ ID NO: 464 и SEQ ID NO: 426, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK6-Fc.

Очистка различных комплексов ALK1-Fc:ALK6-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 41. Получение гетеродимера ALK1-Fc:ALK7-Fc.

Можно получать растворимый гетеромерный комплекс ALK1-Fc:ALK7-Fc, содержащий внеклеточные домены ALK1 человека и ALK7 человека, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. Индивидуальные конструкции обозначаются как слитые белки ALK1-Fc и ALK7-Fc соответственно.

Образованию гетеродимерного ALK1-Fc:ALK7-Fc можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 36.

Электростатический подход.

В первом подходе полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 124-126.

В полипептидной последовательности комплементарного слитого белка ALK7-Fc (SEQ ID NO: 183) используется лидерная последовательность ТРА, и она является следующей:

```
1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAGLKVCV LLCSSNFTC QTEGACWASV
51 MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
101 TASPNAKPLG PMETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR
251 KEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLKSDGSFF
301 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLP G
(SEQ ID NO: 183)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера ALK1-Fc:ALK7-Fc, но не какого-либо из возможных гомодимерных комплексов, в Fc-домен слитого белка может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих кислотные аминокислоты остатками лизина), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 183 необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

Ожидается, что последовательность зрелого слитого белка ALK7-Fc будет следующей (SEQ ID NO: 184), и она необязательно может быть предоставлена с добавленным остатком лизина на С-конце.

```
1 GLKCVCLLCD SSNFTCQTEG ACWASVMLTN GKEQVIKSCV SLPELNAQVF
51 CHSSNNVTKT ECCFTDFCNN ITLHLPTASP NAPKLGPMET GGGTHTCPPC
101 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKENWYV
151 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
201 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
251 EWESNGQPEN NYKTPPVVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
301 EALHNHYTQK SLSLSPG (SEQ ID NO: 184)
```

Слитые белки ALK1-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 184, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK7-Fc.

Обратный электростатический подход.

В обратном подходе внеклеточные домены рецептора связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с первым подходом, описанным выше. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 171-172.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK7-Fc и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей его, представлены в примере 7 в качестве SEQ ID NO: 112-114.

Слитые белки ALK1-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 114, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного

комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK7-Fc.

Гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи. Полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 16 в качестве SEQ ID NO: 413-414.

Комплементарная форма слитого полипептида ALK7-Fc (SEQ ID NO: 475) является следующей:

```
1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAGLKCVC LLCSSNFTC QTEGACWASV
51 MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
101 TASPNAKPLG PMETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR
251 EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF
301 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLP GK
(SEQ ID NO: 475)
```

Лидерная и линкерная последовательности подчеркнуты. Для способствования образованию гетеродимера слитым полипептидом ALK1-Fc SEQ ID NO: 413-414 в Fc-домен слитого полипептида ALK7-Fc может быть внесено две аминокислотные замены (заменяющих серин цистеином и треонин триптофаном), как указано двойным подчеркиванием выше. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 475 необязательно может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

Ожидается, что последовательность зрелого слитого белка ALK7-Fc (SEQ ID NO: 476) будет следующей, и необязательно она может быть предоставлена с удаленным остатком лизина на С-конце.

```
1 GLKCVLLCD SSNFTCQTEG ACWASVMLTN GKEQVIKSCV SLPELNAQVF
51 CHSSNNVTKT ECCFTDFCNN ITLHLPTASP NAPKLGPMET GGGTHTCPPC
101 PABELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
151 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
201 AIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
251 EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
301 EALHNNHTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 476)
```

Белки ALK1-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 414 и SEQ ID NO: 476, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK7-Fc.

Обратный гидрофобный подход.

В другом подходе для способствования образованию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных слитых с Fc белков, Fc-домены изменяют для внесения комплементарных гидрофобных взаимодействий и дополнительной межмолекулярной дисульфидной связи, как описано непосредственно выше. Однако внеклеточные домены рецептора в этом подходе связывают с противоположным представителем взаимодействующей пары Fc по сравнению с описанным выше подходом. В этом примере альтернативная полипептидная последовательность слитого белка ALK1-Fc представлена в примере 36 в качестве SEQ ID NO: 463-464.

Полипептидная последовательность слитого белка ALK7-Fc представлена в примере 7 в качестве SEQ ID NO: 405-406.

Белки ALK1-Fc и ALK7-Fc SEQ ID NO: 464 и SEQ ID NO: 406, соответственно, можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного комплекса, содержащего ALK1-Fc:ALK7-Fc.

Очистка различных комплексов ALK1-Fc:ALK7-Fc может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзивная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Пример 42. Получение дополнительных гетеродимеров, содержащих два рецептора типа I.

Образованию дополнительных гетеродимерных белковых комплексов, содержащих внеклеточные домены двух рецепторов типа I, можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 36. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: для этих вариантов гетеродимеров приведены в таблице ниже, которая для полноты также включает уже рассмотренные гетеродимеры, которые содержат два рецептора типа I (примеры 36-41). Как описано в примерах 36-41, С-концевой лизин каждого слитого белка рецептор-Fc необязательно может быть включен или исключен.

В каждом случае можно получать растворимый гетеромерный комплекс, содержащий внеклеточные домены двух различных рецепторов типа I, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, рас-

положенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. В каждом случае слитые белки можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением варианта гетеромерного белкового комплекса. В каждом случае очистка различных гетеромерных белковых комплексов может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Гетеродимеры рецепторов типа I: типа I

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: для гетеродимеров рецепторов типа I: типа I					
Гетеромерный комплекс слитых белков	Тип пары Fc	Соответствие ECD паре Fc	Слитый белок Рецептор-Fc	Аминокислотная последовательность SEQ ID NO	
				С лидерной последовательностью	Зрелая
ALK1-Fc: ALK2-Fc	Электростатическая	A	ALK1-Fc	124	126
			ALK2-Fc	173	174
		B	ALK1-Fc	171	172
			ALK2-Fc	136	138
	Гидрофобная	A	ALK1-Fc	413	414
			ALK2-Fc	465	466
		B	ALK1-Fc	463	464
			ALK2-Fc	421	422
ALK1-Fc: ALK3-Fc	Электростатическая	A	ALK1-Fc	124	126
			ALK3-Fc	175	176
		B	ALK1-Fc	171	172
			ALK3-Fc	115	117
	Гидрофобная	A	ALK1-Fc	413	414
			ALK3-Fc	467	468
		B	ALK1-Fc	463	464
			ALK3-Fc	407	408
ALK1-Fc: ALK4-Fc	Электростатическая	A	ALK1-Fc	124	126
			ALK4-Fc	177	178
		B	ALK1-Fc	171	172
			ALK4-Fc	104	106
	Гидрофобная	A	ALK1-Fc	413	414
			ALK4-Fc	469	470
		B	ALK1-Fc	463	464

			ALK4-Fc	403	404	
ALK1-Fc: ALK5-Fc	Электроста- тическая	A	ALK1-Fc	124	126	
			ALK5-Fc	179	180	
		B	ALK1-Fc	171	172	
			ALK5-Fc	139	141	
	Гидрофобная	A	ALK1-Fc	413	414	
			ALK5-Fc	471	472	
		B	ALK1-Fc	463	464	
			ALK5-Fc	423	424	
ALK1-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	A	ALK1-Fc	124	126	
			ALK6-Fc	181	182	
		B	ALK1-Fc	171	172	
			ALK6-Fc	142	144	
	Гидрофобная	A	ALK1-Fc	413	414	
			ALK6-Fc	473	474	
		B	ALK1-Fc	463	464	
			ALK6-Fc	425	426	
	ALK1-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	A	ALK1-Fc	124	126
				ALK7-Fc	183	184
			B	ALK1-Fc	171	172
				ALK7-Fc	112	114
Гидрофобная		A	ALK1-Fc	413	414	
			ALK7-Fc	475	476	
		B	ALK1-Fc	463	464	
			ALK7-Fc	405	406	
ALK2-Fc: ALK3-Fc	Электроста- тическая	A	ALK2-Fc	136	138	
			ALK3-Fc	175	176	
		B	ALK2-Fc	173	174	
			ALK3-Fc	115	117	
	Гидрофобная	A	ALK2-Fc	421	422	
			ALK3-Fc	467	468	
		B	ALK2-Fc	465	466	
			ALK3-Fc	407	408	
ALK2-Fc: ALK4-Fc	Электроста- тическая	A	ALK2-Fc	136	138	
			ALK4-Fc	177	178	
		B	ALK2-Fc	173	174	
			ALK4-Fc	104	106	
	Гидрофобная	A	ALK2-Fc	421	422	
			ALK4-Fc	469	470	

		B	ALK2-FC	465	466
			ALK4-FC	403	404
ALK2-FC: ALK5-FC	Электроста- тическая	A	ALK2-FC	136	138
			ALK5-FC	179	180
		B	ALK2-FC	173	174
			ALK5-FC	139	141
	Гидрофобная	A	ALK2-FC	421	422
			ALK5-FC	471	472
		B	ALK2-FC	465	466
			ALK5-FC	423	424
ALK2-FC: ALK6-FC	Электроста- тическая	A	ALK2-FC	136	138
			ALK6-FC	181	182
		B	ALK2-FC	173	174
			ALK6-FC	142	144
	Гидрофобная	A	ALK2-FC	421	422
			ALK6-FC	473	474
		B	ALK2-FC	465	466
			ALK6-FC	425	426
ALK2-FC: ALK7-FC	Электроста- тическая	A	ALK2-FC	136	138
			ALK7-FC	183	184
		B	ALK2-FC	173	174
			ALK7-FC	112	114
	Гидрофобная	A	ALK2-FC	421	422
			ALK7-FC	475	476
		B	ALK2-FC	465	466
			ALK7-FC	405	406
ALK3-FC: ALK4-FC	Электроста- тическая	A	ALK3-FC	115	117
			ALK4-FC	177	178
		B	ALK3-FC	175	176
			ALK4-FC	104	106
	Гидрофобная	A	ALK3-FC	407	408
			ALK4-FC	469	470
		B	ALK3-FC	467	468
			ALK4-FC	403	404
ALK3-FC: ALK5-FC	Электроста- тическая	A	ALK3-FC	115	117
			ALK5-FC	179	180
		B	ALK3-FC	175	176
			ALK5-FC	139	141
	Гидрофобная	A	ALK3-FC	407	408

			ALK5-Fc	471	472
		B	ALK3-Fc	467	468
			ALK5-Fc	423	424
ALK3-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	A	ALK3-Fc	115	117
			ALK6-Fc	181	182
		B	ALK3-Fc	175	176
			ALK6-Fc	142	144
	Гидрофобная	A	ALK3-Fc	407	408
			ALK6-Fc	473	474
B		ALK3-Fc	467	468	
		ALK6-Fc	425	426	
ALK3-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	A	ALK3-Fc	115	117
			ALK7-Fc	183	184
		B	ALK3-Fc	175	176
			ALK7-Fc	112	114
	Гидрофобная	A	ALK3-Fc	407	408
			ALK7-Fc	475	476
B		ALK3-Fc	467	468	
		ALK7-Fc	405	406	
ALK4-Fc: ALK5-Fc	Электроста- тическая	A	ALK4-Fc	104	106
			ALK5-Fc	179	180
		B	ALK4-Fc	177	178
			ALK5-Fc	139	141
	Гидрофобная	A	ALK4-Fc	403	404
			ALK5-Fc	471	472
B		ALK4-Fc	469	470	
		ALK5-Fc	423	424	
ALK4-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	A	ALK4-Fc	104	106
			ALK6-Fc	181	182
		B	ALK4-Fc	177	178
			ALK6-Fc	142	144
	Гидрофобная	A	ALK4-Fc	403	404
			ALK6-Fc	473	474
B		ALK4-Fc	469	470	
		ALK6-Fc	425	426	
ALK4-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	A	ALK4-Fc	104	106
			ALK7-Fc	183	184
		B	ALK4-Fc	177	178
			ALK7-Fc	112	114

	Гидрофобная	А	ALK4-Fc	403	404
			ALK7-Fc	475	476
		В	ALK4-Fc	469	470
			ALK7-Fc	405	406
ALK5-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	А	ALK5-Fc	139	141
			ALK6-Fc	181	182
		В	ALK5-Fc	179	180
			ALK6-Fc	142	144
	Гидрофобная	А	ALK5-Fc	423	424
			ALK6-Fc	473	474
		В	ALK5-Fc	471	472
			ALK6-Fc	425	426
ALK5-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	А	ALK5-Fc	139	141
			ALK7-Fc	183	184
		В	ALK5-Fc	179	180
			ALK7-Fc	112	114
	Гидрофобная	А	ALK5-Fc	423	424
			ALK7-Fc	475	476
		В	ALK5-Fc	471	472
			ALK7-Fc	405	406
ALK6-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	А	ALK6-Fc	142	144
			ALK7-Fc	183	184
		В	ALK6-Fc	181	182
			ALK7-Fc	112	114
	Гидрофобная	А	ALK6-Fc	425	426
			ALK7-Fc	475	476
		В	ALK6-Fc	473	474
			ALK7-Fc	405	406

Пример 43. Получение дополнительных гетеродимеров, содержащих рецептор типа I и рецептор типа II.

Образованию дополнительных гетеродимерных белковых комплексов, содержащих внеклеточные домены рецептора типа I и рецептора типа II, можно способствовать с использованием подходов, сходных с подходами, описанными в примере 1. Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: для этих вариантов гетеродимеров рассмотрены в таблице ниже, которая для полноты включает уже рассмотренные гетеродимеры, которые содержат рецептор типа I и рецептор типа II (примеры 1-29). Как рассмотрено в примерах 1-29, С-концевой остаток лизина каждого слитого белка рецептор-Fc необязательно может быть включен или исключен.

В каждом случае можно получать растворимый гетеромерный комплекс, содержащий внеклеточные домены рецептора типа I и рецептора типа II, каждый из которых слит с Fc-доменом, с линкером, расположенным между внеклеточным доменом и Fc-доменом. В каждом случае слитые белки можно совместно экспрессировать и очищать из клеточной линии CHO с получением вариантов гетеромерных белковых комплексов. В каждом случае очистка различных гетеромерных белковых комплексов может быть осуществлена посредством серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q-сефарозой, хроматография с фенолсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Гетеродимеры рецепторов типа I: типа II

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: для гетеродимеров типа I: типа II					
Гетеромерный комплекс слитых белков	Тип пары Fc	Соответствие ECD паре Fc	Слитый белок рецептор-Fc	Аминокислотная последовательность SEQ ID NO	
				С лидерной последовательностью	Зрелая
ActRIIA-Fc: ALK1-Fc	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			ALK1-Fc	124	126
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			ALK1-Fc	171	172
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK1-Fc	413	414
		B	ActRIIA-Fc	451	452
			ALK1-Fc	463	464
ActRIIA-Fc:	Электростатическая	A	ActRIIA-Fc	118	120

ALK2-Fc	тическая		ALK2-Fc	136	138
		B	ActRIIA-Fc	151	152
			ALK2-Fc	173	174
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK2-Fc	421	422
		B	ActRIIA-Fc	451	452
ALK2-Fc	465		466		
ActRIIA-Fc: ALK3-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			ALK3-Fc	115	117
		B	ActRIIA-Fc	151	152
	ALK3-Fc		175	176	
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK3-Fc	407	408
B		ActRIIA-Fc	451	452	
	ALK3-Fc	467	468		
ActRIIA-Fc: ALK4-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			ALK4-Fc	104	106
		B	ActRIIA-Fc	151	152
	ALK4-Fc		177	178	
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK4-Fc	403	404
B		ActRIIA-Fc	451	452	
	ALK4-Fc	469	470		
ActRIIA-Fc: ALK5-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			ALK5-Fc	139	141
		B	ActRIIA-Fc	151	152
	ALK5-Fc		179	180	
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK5-Fc	423	424
B		ActRIIA-Fc	451	452	
	ALK5-Fc	471	472		
ActRIIA-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIA-Fc	118	120
			ALK6-Fc	142	144
		B	ActRIIA-Fc	151	152
	ALK6-Fc		181	182	
	Гидрофобная	A	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK6-Fc	425	426
B		ActRIIA-Fc	451	452	
	ALK6-Fc	473	474		

ActRIIA-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIA-Fc	118	120
			ALK7-Fc	112	114
		В	ActRIIA-Fc	151	152
			ALK7-Fc	183	184
	Гидрофобная	А	ActRIIA-Fc	409	410
			ALK7-Fc	405	406
В		ActRIIA-Fc	451	452	
		ALK7-Fc	475	476	
ActRIIB-Fc: ALK1-Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK1-Fc	124	126
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK1-Fc	171	172
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK1-Fc	413	414
В		ActRIIB-Fc	453	454	
		ALK1-Fc	463	464	
ActRIIB-Fc: ALK2-Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK2-Fc	136	138
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK2-Fc	173	174
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK2-Fc	421	422
В		ActRIIB-Fc	453	454	
		ALK2-Fc	465	466	
ActRIIB-Fc: ALK3-Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK3-Fc	115	117
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK3-Fc	175	176
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK3-Fc	407	408
В		ActRIIB-Fc	453	454	
		ALK3-Fc	467	468	
ActRIIB-Fc: ALK4-Fc	Электроста- тическая	А	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK4-Fc	104	106
		В	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK4-Fc	177	178
	Гидрофобная	А	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK4-Fc	403	404
В		ActRIIB-Fc	453	454	
		ActRIIB-Fc	453	454	

			ALK4-Fc	469	470
ActRIIB-Fc: ALK5-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK5-Fc	139	141
		B	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK5-Fc	179	180
	Гидрофобная	A	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK5-Fc	423	424
B		ActRIIB-Fc	453	454	
			ALK5-Fc	471	472
ActRIIB-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK6-Fc	142	144
		B	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK6-Fc	181	182
	Гидрофобная	A	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK6-Fc	425	426
B		ActRIIB-Fc	453	454	
			ALK6-Fc	473	474
ActRIIB-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	A	ActRIIB-Fc	100	102
			ALK7-Fc	112	114
		B	ActRIIB-Fc	153	154
			ALK7-Fc	183	184
	Гидрофобная	A	ActRIIB-Fc	401	402
			ALK7-Fc	405	406
B		ActRIIB-Fc	453	454	
			ALK7-Fc	475	476
BMPRII-Fc: ALK1-Fc	Электроста- тическая	A	BMPRII-Fc	121	123
			ALK1-Fc	124	126
		B	BMPRII-Fc	155	156
			ALK1-Fc	171	172
	Гидрофобная	A	BMPRII-Fc	411	412
			ALK1-Fc	413	414
B		BMPRII-Fc	455	456	
			ALK1-Fc	463	464
BMPRII-Fc: ALK2-Fc	Электроста- тическая	A	BMPRII-Fc	121	123
			ALK2-Fc	136	138
		B	BMPRII-Fc	155	156
			ALK2-Fc	173	174
	Гидрофобная	A	BMPRII-Fc	411	412
ALK2-Fc			421	422	

		В	ВМРІІ-Fc	455	456
			АLK2-Fc	465	466
ВМРІІ-Fc: АLK3-Fc	Электроста- тическая	А	ВМРІІ-Fc	121	123
			АLK3-Fc	115	117
	В	ВМРІІ-Fc	155	156	
		АLK3-Fc	175	176	
	Гидрофобная	А	ВМРІІ-Fc	411	412
			АLK3-Fc	407	408
В	ВМРІІ-Fc	455	456		
АLK3-Fc	467	468			
ВМРІІ-Fc: АLK4-Fc	Электроста- тическая	А	ВМРІІ-Fc	121	123
			АLK4-Fc	104	106
	В	ВМРІІ-Fc	155	156	
		АLK4-Fc	177	178	
	Гидрофобная	А	ВМРІІ-Fc	411	412
			АLK4-Fc	403	404
В	ВМРІІ-Fc	455	456		
АLK4-Fc	469	470			
ВМРІІ-Fc: АLK5-Fc	Электроста- тическая	А	ВМРІІ-Fc	121	123
			АLK5-Fc	139	141
	В	ВМРІІ-Fc	155	156	
		АLK5-Fc	179	180	
	Гидрофобная	А	ВМРІІ-Fc	411	412
			АLK5-Fc	423	424
В	ВМРІІ-Fc	455	456		
АLK5-Fc	471	472			
ВМРІІ-Fc: АLK6-Fc	Электроста- тическая	А	ВМРІІ-Fc	121	123
			АLK6-Fc	142	144
	В	ВМРІІ-Fc	155	156	
		АLK6-Fc	181	182	
	Гидрофобная	А	ВМРІІ-Fc	411	412
			АLK6-Fc	425	426
В	ВМРІІ-Fc	455	456		
АLK6-Fc	473	474			
ВМРІІ-Fc: АLK7-Fc	Электроста- тическая	А	ВМРІІ-Fc	121	123
			АLK7-Fc	112	114
	В	ВМРІІ-Fc	155	156	
		АLK7-Fc	183	184	
Гидрофобная	А	ВМРІІ-Fc	411	412	

			ALK7-Fc	405	406
		B	BMPRII-Fc	455	456
			ALK7-Fc	475	476
MISRII-Fc: ALK1-Fc	Электроста- тическая	A	MISRII-Fc	133	135
			ALK1-Fc	124	126
		B	MISRII-Fc	161	162
			ALK1-Fc	171	172
	Гидрофобная	A	MISRII-Fc	419	420
		ALK1-Fc	413	414	
		B	MISRII-Fc	457	458
			ALK1-Fc	463	464
MISRII-Fc: ALK2-Fc	Электроста- тическая	A	MISRII-Fc	133	135
			ALK2-Fc	136	138
		B	MISRII-Fc	161	162
			ALK2-Fc	173	174
	Гидрофобная	A	MISRII-Fc	419	420
		ALK2-Fc	421	422	
		B	MISRII-Fc	457	458
			ALK2-Fc	465	466
MISRII-Fc: ALK3-Fc	Электроста- тическая	A	MISRII-Fc	133	135
			ALK3-Fc	115	117
		B	MISRII-Fc	161	162
			ALK3-Fc	175	176
	Гидрофобная	A	MISRII-Fc	419	420
		ALK3-Fc	407	408	
		B	MISRII-Fc	457	458
			ALK3-Fc	467	468
MISRII-Fc: ALK4-Fc	Электроста- тическая	A	MISRII-Fc	133	135
			ALK4-Fc	104	106
		B	MISRII-Fc	161	162
			ALK4-Fc	177	178
	Гидрофобная	A	MISRII-Fc	419	420
		ALK4-Fc	403	404	
		B	MISRII-Fc	457	458
			ALK4-Fc	469	470
MISRII-Fc: ALK5-Fc	Электроста- тическая	A	MISRII-Fc	133	135
			ALK5-Fc	139	141
		B	MISRII-Fc	161	162
			ALK5-Fc	179	180

	Гидрофобная	А	MISRII-Fc	419	420
			ALK5-Fc	423	424
		В	MISRII-Fc	457	458
			ALK5-Fc	471	472
MISRII-Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	А	MISRII-Fc	133	135
			ALK6-Fc	142	144
		В	MISRII-Fc	161	162
			ALK6-Fc	181	182
	Гидрофобная	А	MISRII-Fc	419	420
			ALK6-Fc	425	426
		В	MISRII-Fc	457	458
			ALK6-Fc	473	474
MISRII-Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	А	MISRII-Fc	133	135
			ALK7-Fc	112	114
		В	MISRII-Fc	161	162
			ALK7-Fc	183	184
	Гидрофобная	А	MISRII-Fc	419	420
			ALK7-Fc	405	406
		В	MISRII-Fc	457	458
			ALK7-Fc	475	476
TGFβRII _{SHORT} - Fc: ALK1-Fc	Электроста- тическая	А	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK1-Fc	124	126
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK1-Fc	171	172
	Гидрофобная	А	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK1-Fc	413	414
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ALK1-Fc	463	464
TGFβRII _{SHORT} - Fc: ALK2-Fc	Электроста- тическая	А	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK2-Fc	136	138
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK2-Fc	173	174
	Гидрофобная	А	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK2-Fc	421	422
		В	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ALK2-Fc	465	466
TGFβRII _{SHORT} - Fc:	Электроста- тическая	А	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK3-Fc	115	117

ALK3-Fc		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK3-Fc	175	176
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK3-Fc	407	408
	B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460	
		ALK3-Fc	467	468	
TGFβRII _{SHORT} -Fc: ALK4-Fc	Электростатическая	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK4-Fc	104	106
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK4-Fc	177	178
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK4-Fc	403	404
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ALK4-Fc	469	470
TGFβRII _{SHORT} -Fc: ALK5-Fc	Электростатическая	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK5-Fc	139	141
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK5-Fc	179	180
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK5-Fc	423	424
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ALK5-Fc	471	472
TGFβRII _{SHORT} -Fc: ALK6-Fc	Электростатическая	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK6-Fc	142	144
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK6-Fc	181	182
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK6-Fc	425	426
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ALK6-Fc	473	474
TGFβRII _{SHORT} -Fc: ALK7-Fc	Электростатическая	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	127	129
			ALK7-Fc	112	114
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	157	158
			ALK7-Fc	183	184
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{SHORT} -Fc	415	416
			ALK7-Fc	405	406
		B	TGFβRII _{SHORT} -Fc	459	460
			ALK7-Fc	475	476

TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK1-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK1-Fc	124	126
	Гидрофобная	B	TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK1-Fc	171	172
		A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK1-Fc	413	414
B	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462		
	ALK1-Fc	463	464		
TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK2-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK2-Fc	136	138
	Гидрофобная	B	TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK2-Fc	173	174
		A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK2-Fc	421	422
B	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462		
	ALK2-Fc	465	466		
TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK3-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK3-Fc	115	117
	Гидрофобная	B	TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK3-Fc	175	176
		A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK3-Fc	407	408
B	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462		
	ALK3-Fc	467	468		
TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK4-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK4-Fc	104	106
	Гидрофобная	B	TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK4-Fc	177	178
		A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK4-Fc	403	404
B	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462		
	ALK4-Fc	469	470		
TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK5-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK5-Fc	139	141
	Гидрофобная	B	TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK5-Fc	179	180
		A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK5-Fc	423	424

		В	TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
			ALK5-Fc	471	472
TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK6-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK6-Fc	142	144
	В		TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK6-Fc	181	182
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK6-Fc	425	426
В		TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462	
		ALK6-Fc	473	474	
TGFβRII _{LONG} -Fc: ALK7-Fc	Электроста- тическая	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	130	132
			ALK7-Fc	112	114
	В		TGFβRII _{LONG} -Fc	159	160
			ALK7-Fc	183	184
	Гидрофобная	A	TGFβRII _{LONG} -Fc	417	418
			ALK7-Fc	405	406
	В		TGFβRII _{LONG} -Fc	461	462
			ALK7-Fc	475	476

В целом эти примеры показывают, что полипептиды рецепторов типа I и типа II, когда находятся в контексте гетеромерного комплекса, образуют новые связывающие карманы, которые демонстрируют измененную селективность относительно любого типа гомомерного комплекса, что позволяет получение новых белковых средств для возможного применения в качестве лекарственных средств.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растворимый рекомбинантный гетеромультимер, содержащий полипептид подобной рецептору активина киназы-3 (ALK3) и полипептид рецептора активина типа IIB (ActRIIB), где полипептид ALK3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 61-130 последовательности SEQ ID NO: 22, и где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1, где полипептид ActRIIB не содержит аспарагиновую кислоту (D) в аминокислотном положении, соответствующему L79 последовательности SEQ ID NO: 1, и где гетеромультимер способен связываться с одним или более из активина B, BMP4 и GDF8.

2. Гетеромультимер по п.1, где полипептид ALK3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 61-130 последовательности SEQ ID NO: 22.

3. Гетеромультимер по п.1 или 2, где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1.

4. Гетеромультимер по любому из пп.1-3, где полипептид ALK3 содержит аминокислоты 61-130 последовательности SEQ ID NO: 22.

5. Гетеромультимер по любому из пп.1-4, где полипептид ActRIIB содержит аминокислоты 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1.

6. Гетеромультимер по любому из пп.1-5, где гетеромультимер представляет собой гетеродимер.

7. Гетеромультимер по любому из пп.1-6, где полипептид ALK3 представляет собой слитый белок, содержащий константную область из тяжелой цепи IgG, и где полипептид ActRIIB представляет собой слитый белок, содержащий константную область тяжелой цепи IgG.

8. Гетеромультимер по п.7, где константная область тяжелой цепи IgG представляет собой Fc-домен иммуноглобулина.

9. Гетеромультимер по п.7 или 8, где гетерологичная часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 200-212.

10. Гетеромультимер по п.8 или 9, где Fc-домен иммуноглобулина содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые ингибируют образование гомодимера.

11. Гетеромультимер по любому из пп.1-10, где полипептид ALK3 и/или полипептид ActRIIB содержит один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты и аминокислоты, конъюгированной с липидной частью.

12. Гетеромультимер по п.11, где полипептид ALK3 и/или полипептид ActRIIB является гликозили-

рованным посредством экспрессии полипептида рецептора типа I в клетке CHO.

13. Гетеромультимер по любому из пп.1-12, где гетеромультимер имеет одну или несколько из следующих характеристик:

i) связывается с лигандом суперсемейства TGF-бета с K_D по меньшей мере 10^{-7} M; и

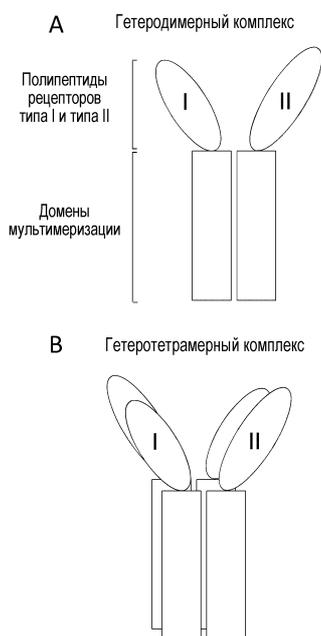
ii) ингибирует опосредуемую рецептором типа I и/или рецептором типа II белков суперсемейства TGF β передачу сигнала в клетке.

14. Гетеромультимер по любому из пп.1-13, где гетеромультимер связывается с одним или несколькими из BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF11, активина A и активина B.

15. Гетеромультимер по любому из пп.1-14, где гетеромультимер ингибирует активность одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF-бета в клеточном анализе.

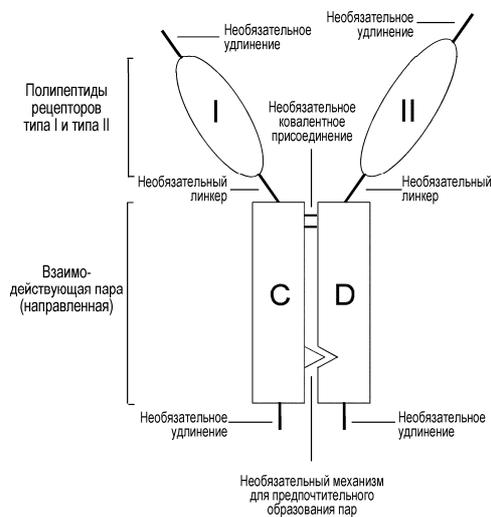
16. Гетеромультимер по п.15, где лиганд суперсемейства TGF-бета выбран из BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF11, активина A и активина B.

17. Фармацевтический препарат для лечения заболевания или нарушения, содержащий гетеромультимер по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.



Фиг. 1

Схематическое изображение гетеромерного белкового комплекса



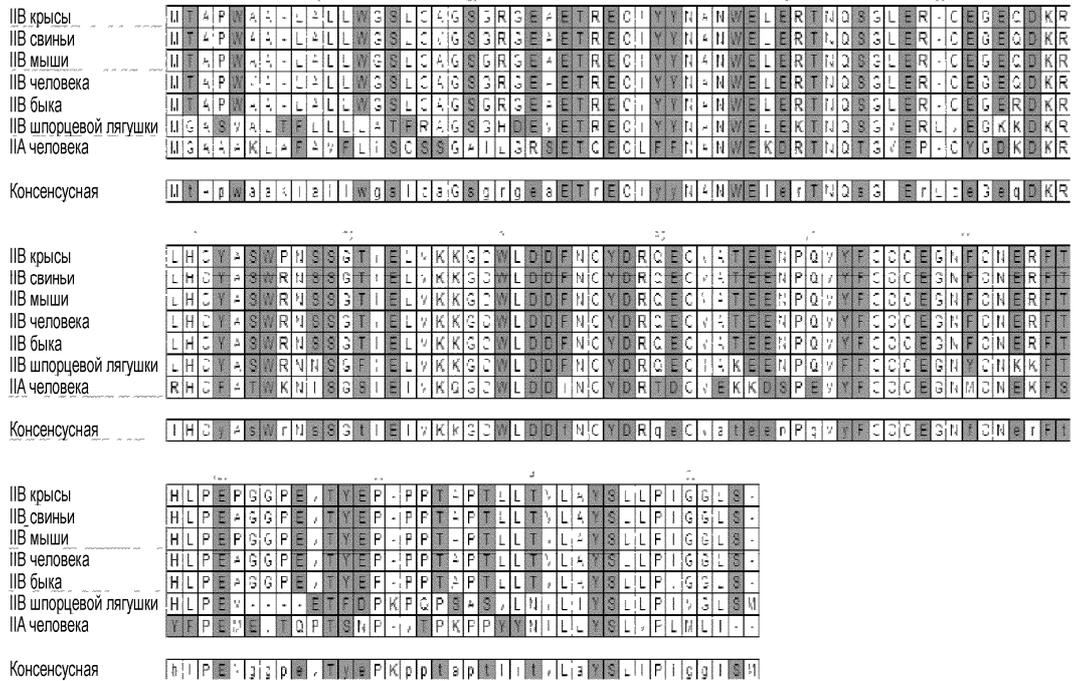
Фиг. 2

ActRIIa ILGRSETQEC IFFNANWEKD RTNQTGVVPC YGDKDKRPHC FATWKNISGS
 ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKGGCWL DDINCYDRFD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
 IELVKKGCWL DDFNICYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT
 GGPEVTYEPP PTAPT

Фиг. 3



Фиг. 4

```

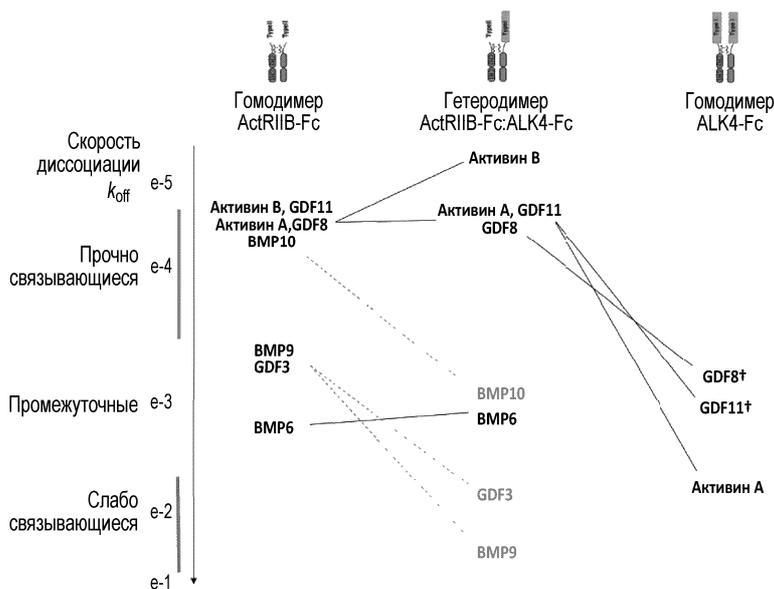
IgG1  -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  53
IgG4  ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF  57
IgG2  -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF  51
IgG3  EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF  60
      ** **** . * *****:*****:****:*

IgG1  NQYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  113
IgG4  NQYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT  117
IgG2  NQYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT  111
IgG3  KQYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  120
      :*****:***:*****:*****:****:*

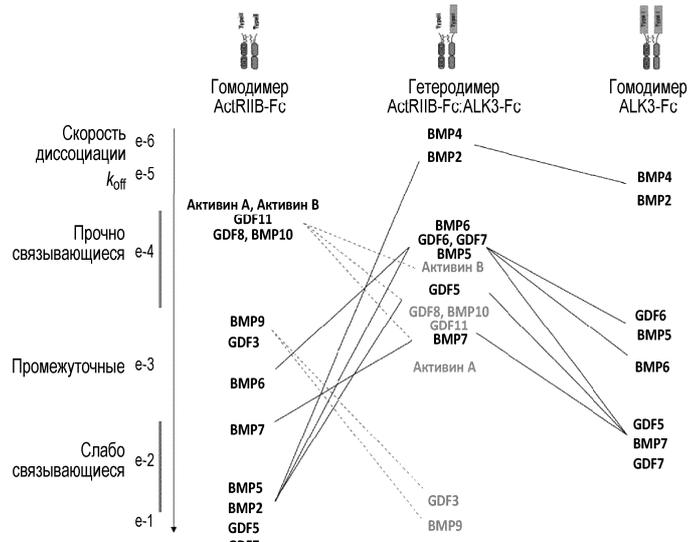
IgG1  ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  173
IgG4  ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  177
IgG2  ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  171
IgG3  ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP  180
      ***:*****:*****:*****:****:*

IgG1  PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  225
IgG4  PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK  229
IgG2  PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  223
IgG3  PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK  232
      *:*****:*****:***:*****:***** **
    
```

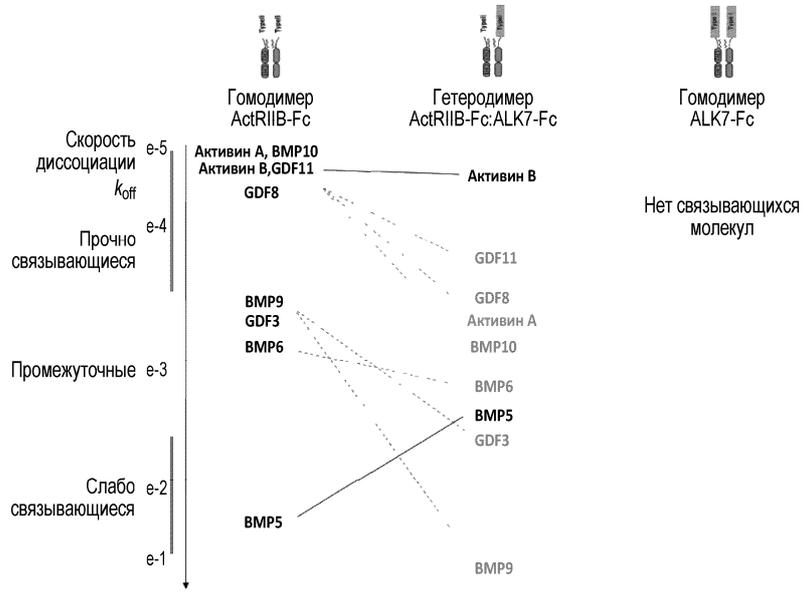
Фиг. 5



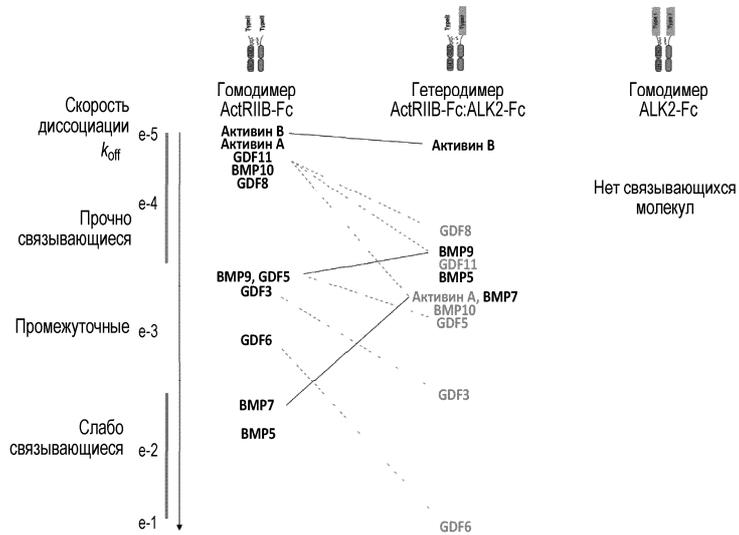
Фиг. 6



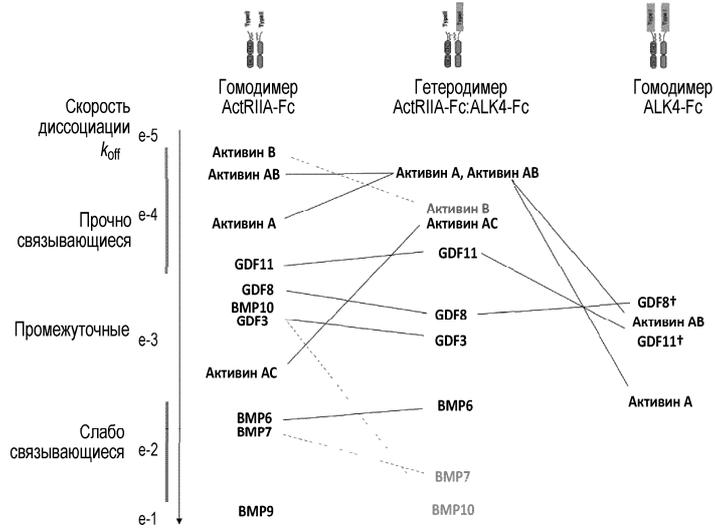
Фиг. 7



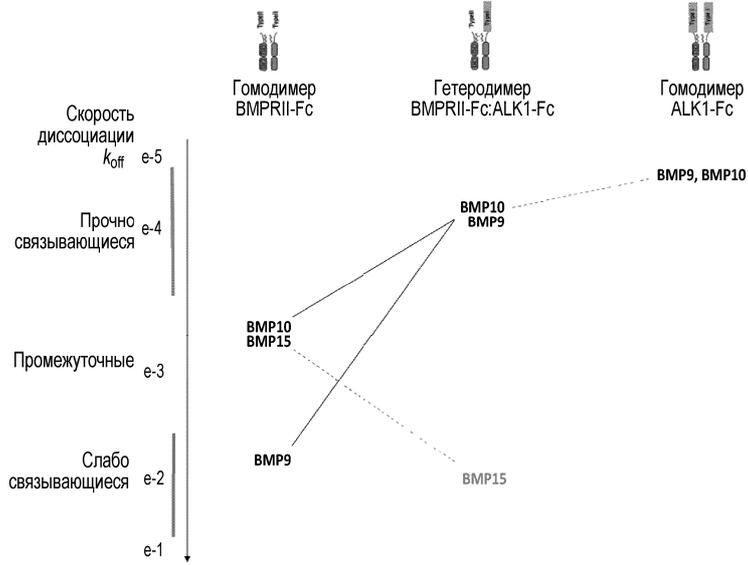
Фиг. 8



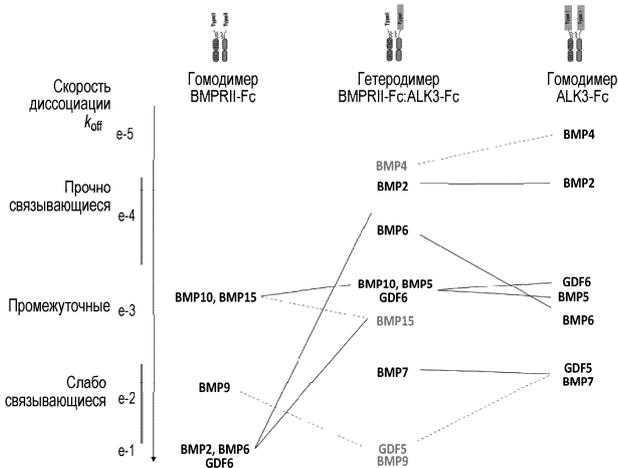
Фиг. 9



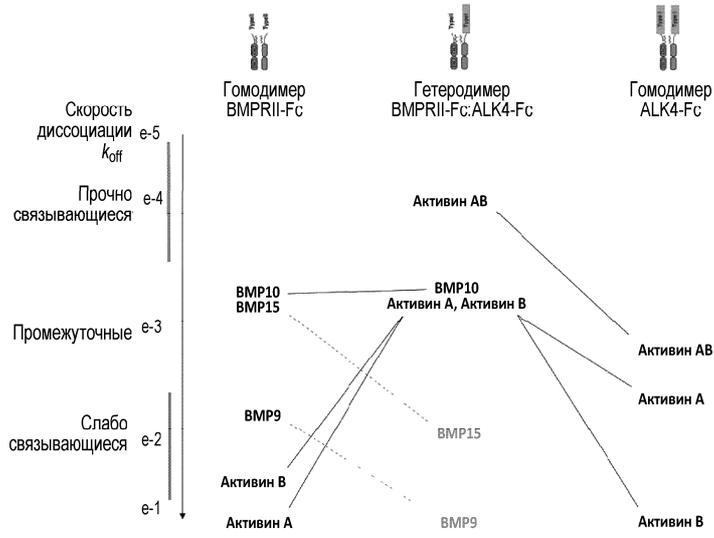
Фиг. 10



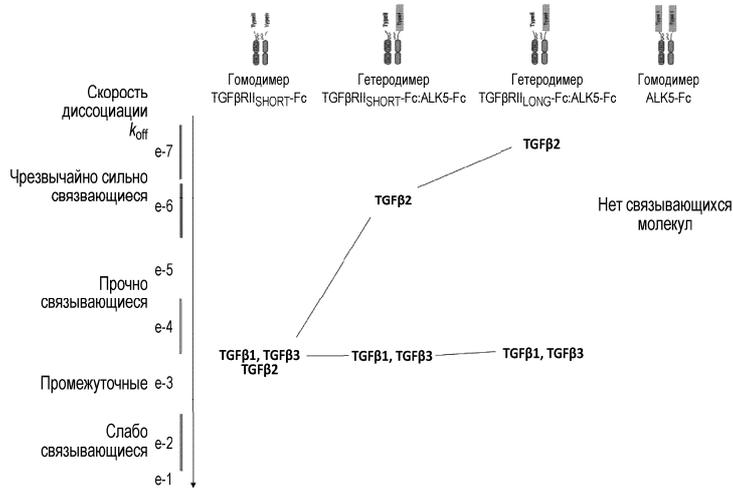
Фиг. 11



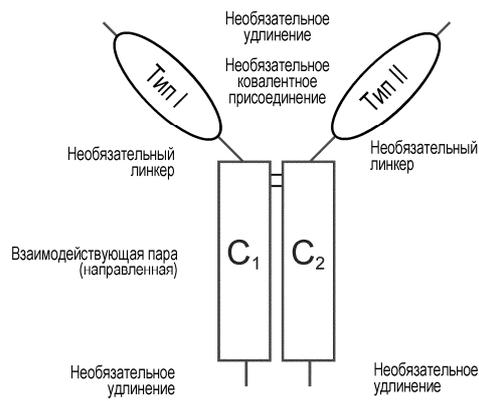
Фиг. 12



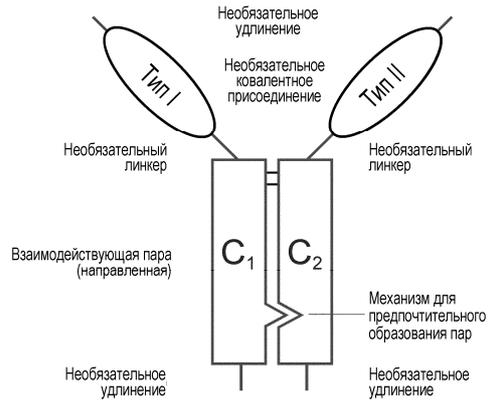
Фиг. 13



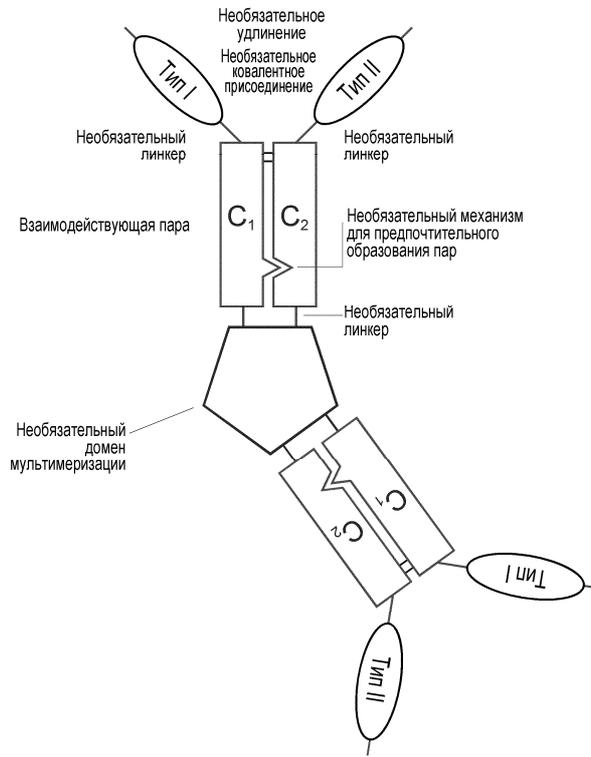
Фиг. 14



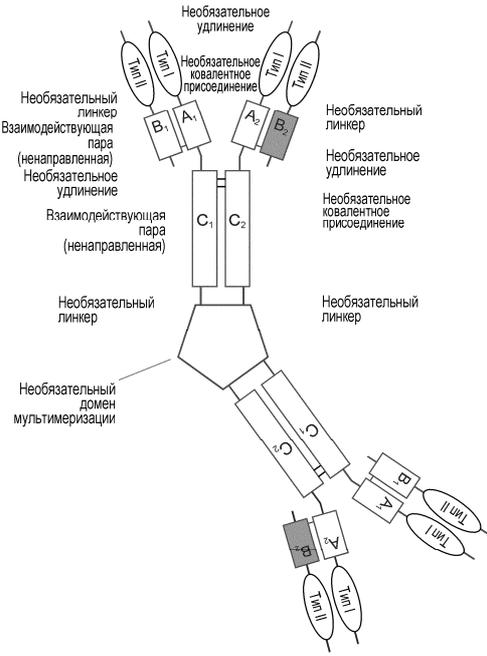
Фиг. 15А



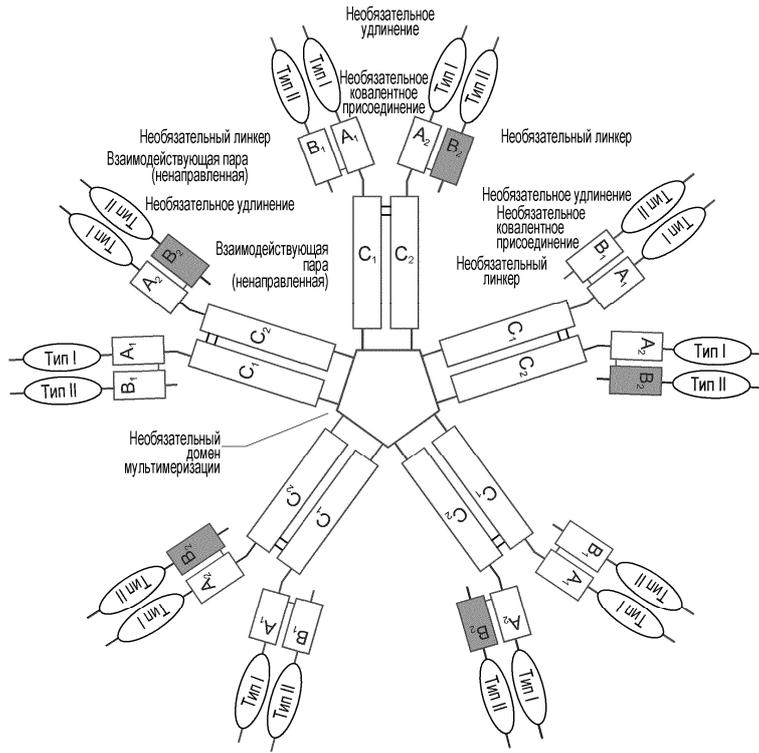
Фиг. 15В



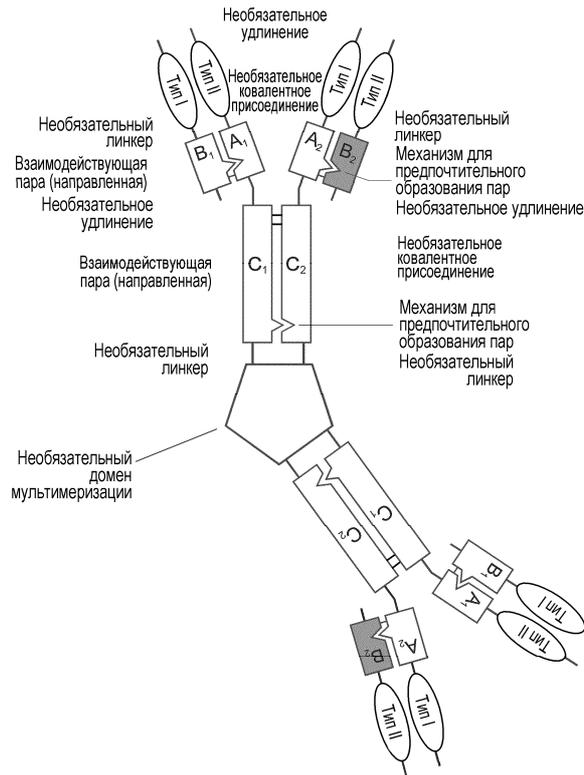
Фиг. 15С



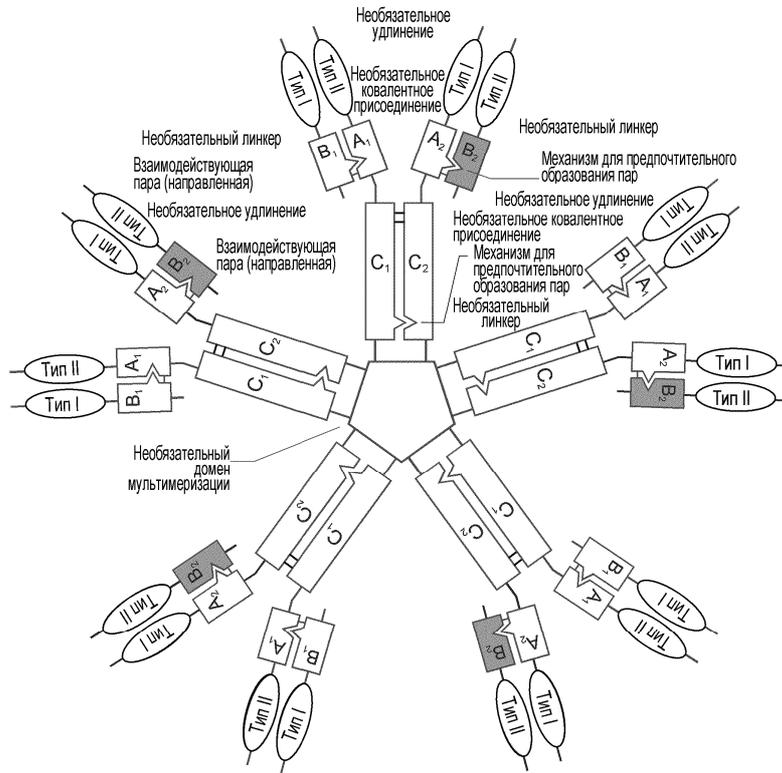
Фиг. 16С



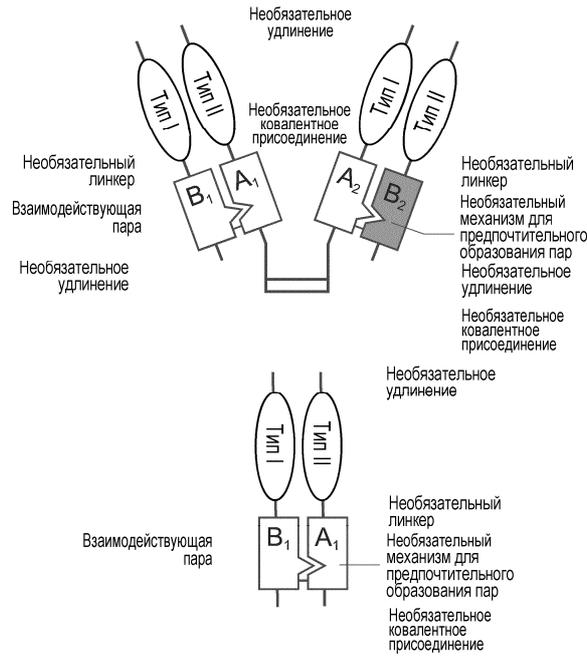
Фиг. 16D



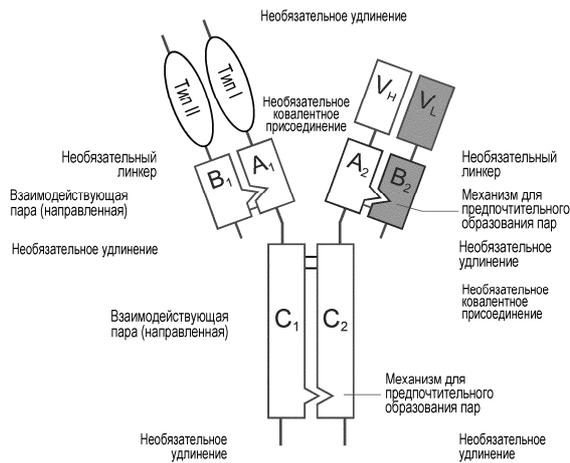
Фиг. 16Е



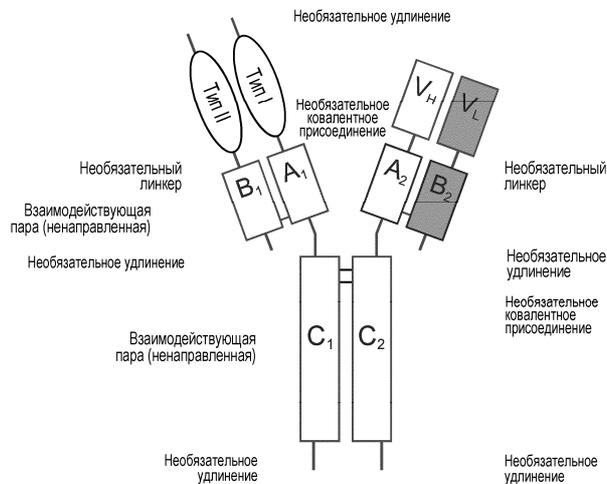
Фиг. 16F



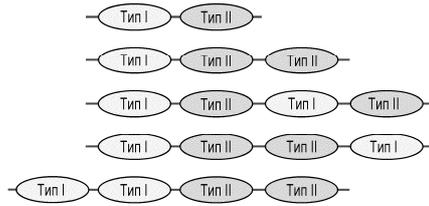
Фиг. 16G



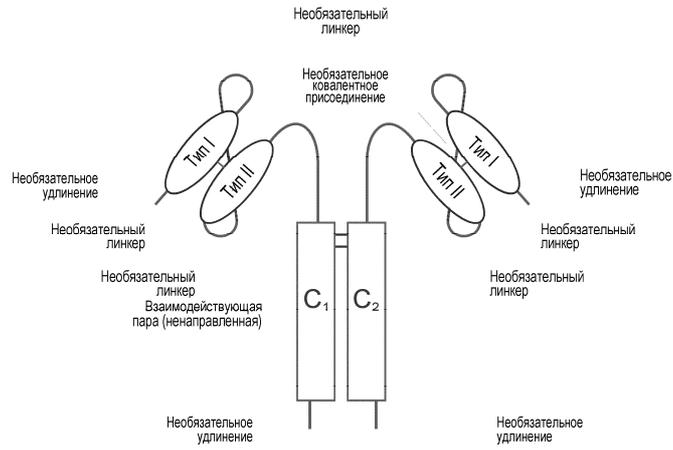
Фиг. 17A



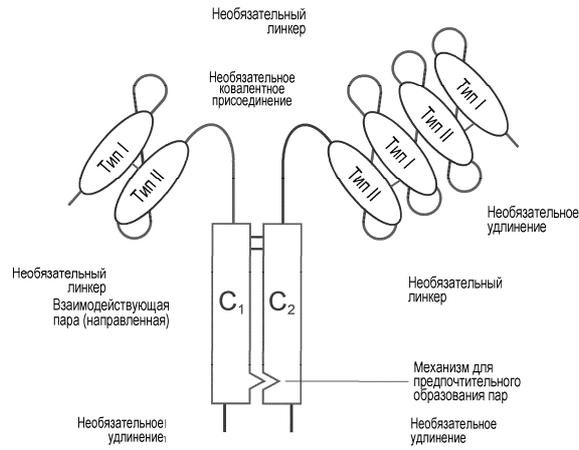
Фиг. 17B



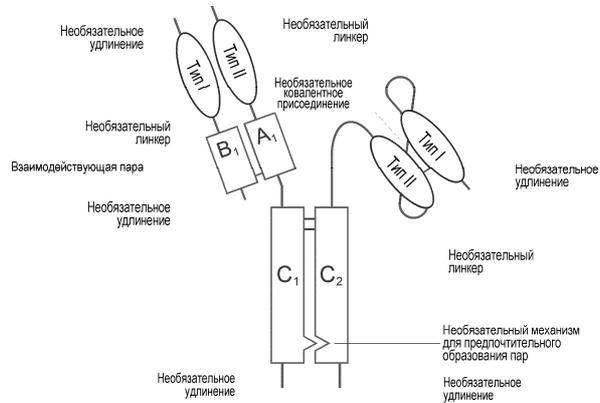
Фиг. 18



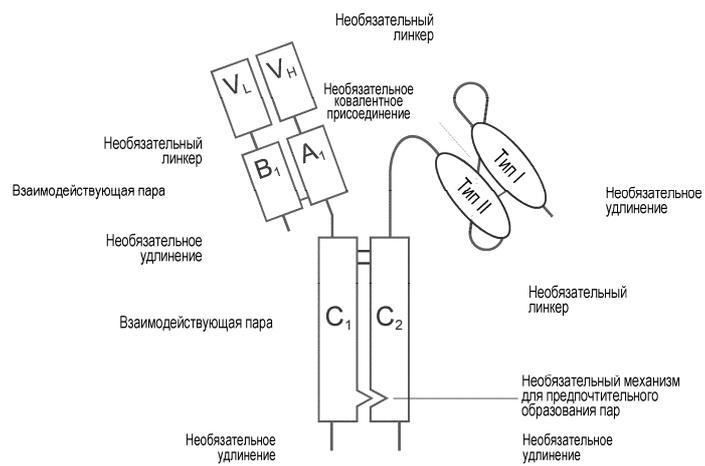
Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 19С



Фиг. 19D

