

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040176**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.27 | (51) Int. Cl. C07K 14/71 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 21/06 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201792217 | |
| (22) Дата подачи заявки
2016.04.06 | |

(54) **ГЕТЕРОМУЛЬТИМЕРЫ ALK4:АСТРИПВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

- | | |
|---|---|
| (31) 62/143,579; 62/220,836 | (56) WO-A2-2008097541 |
| (32) 2015.04.06; 2015.09.18 | WO-A1-2010019261 |
| (33) US | WO-A1-2010083034 |
| (43) 2018.04.30 | ATTIE K. et al., A phase 1 study of ACE-536, a regulator of erythroid differentiation, in healthy volunteers, 2014, American Journal of Hematology, Vol. 89, No. 7, pg. 766-770 Introduction |
| (86) PCT/US2016/026269 | WO-A2-2008073351 |
| (87) WO 2016/164497 2016.10.13 | WO-A2-1994011502 |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКСЕЛЕРОН ФАРМА ИНК. (US) | |
| (72) Изобретатель:
Кумар Равиндра, Гринберг Ася, Сако Дайани С., Пирсалл Роберт Скотт, Кастонгэй Роузлин (US) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

- (57) Изобретение относится к растворимым гетеромерным полипептидным комплексам, содержащим внеклеточный домен рецептора ALK4 и внеклеточный домен ActRIIB. Такие растворимые комплексы ALK4:ActRIIB можно использовать для того, чтобы регулировать (стимулировать или ингибировать) рост тканей или клеток, включая, например, мышечную, костную, хрящевую, жировую, нервную ткань, опухоли и/или злокачественные клетки. Такие комплексы ALK4:ActRIIB также можно использовать для того, чтобы усовершенствовать формирование мышцы, формирование кости, метаболические параметры и нарушения, связанные с этими тканями, клеточными сетями, почечной и эндокринной системами.

040176 B1

040176 B1

Перекрестная ссылка на связанные заявки

По данной заявке испрашивают преимущество приоритета предварительной заявки США с серийным номером 62/143,579, поданной 6 апреля 2015 года; и предварительной заявки США с серийным номером 62/220,836, поданной 18 сентября 2015 года. Раскрытие каждой из приведенных выше заявок включено, таким образом, посредством ссылки в полном объеме.

Предпосылки изобретения

Суперсемейство трансформирующего фактора роста β (TGF- β) содержит различные факторы роста, которые имеют общие элементы последовательности и структурные мотивы. Известно, что эти белки проявляют биологические эффекты в широком спектре типов клеток как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Члены суперсемейства выполняют важные функции во время эмбрионального развития при формировании структур и тканевой специализации и могут влиять на различные процессы дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиоогенез, гемопоэз, нейрогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. Семейство делят на две основные филогенетические клады: более недавно возникшие члены суперсемейства, которые включают TGF- β , активины и NODAL, и клада более отдаленно родственных белков суперсемейства, которые включают множество BMP и GDF [Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870]. Члены семейства TGF- β имеют разнообразные, часто комплементарные биологические эффекты. Посредством манипулирования активностью члена семейства TGF- β часто можно вызывать значимые физиологические изменения в организме. Например, породы крупного рогатого скота Piedmontese и Belgian Blue несут мутацию с потерей функции в гене GDF8 (также называемом миостатином), которая вызывает заметное увеличение мышечной массы [Grobet et al. (1997) Nat Genet 17(1):71-4]. Кроме того, у человека, неактивные аллели GDF8 связаны с увеличенной мышечной массой и, по сообщениям, исключительной силой [Schuelke et al. (2004) N Engl J Med 350:2682-8].

Изменений в фиброзе, мышце, кости, жире, красных клетках крови и других тканях можно достигать посредством усиления или ингибирования передачи внутриклеточных сигналов (например, SMAD 1, 2, 3, 5 и/или 8), которую опосредуют лиганды семейства TGF- β . Таким образом, существует необходимость в средствах, которые регулируют активность различных лигандов суперсемейства TGF- β .

Сущность изобретения

Как раскрыто в настоящем описании, обнаружено, что гетеродимерный белковый комплекс ALK4:ActRIIB является уникальным антагонистом лигандов суперсемейства TGF- β , который демонстрирует отличающиеся профиль/избирательность связывания лигандов по сравнению с соответствующими гомодимерами ActRIIB и ALK4. В частности, образцовый гетеродимер ALK4:ActRIIB демонстрирует усиленное связывание с активинном В по сравнению с любым гомодимером, сохраняет сильное связывание с активинном А, GDF8 и GDF11, как наблюдали с использованием гомодимера ActRIIB, и демонстрирует по существу сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3. Фактически гетеродимер ALK4:ActRIIB демонстрирует от низкой до нулевой наблюдаемой аффинности к BMP9, хотя этот лиганд прочно связывается с гомодимером ActRIIB. См. фиг. 6. Следовательно, эти результаты демонстрируют, что гетеродимеры ALK4:ActRIIB являются более избирательными антагонистами (ингибиторами) определенных лигандов суперсемейства TGF- β по сравнению с гомодимерами ActRIIB. Соответственно, гетеродимер ALK4:ActRIIB более эффективен, чем гомодимер ActRIIB, в определенных применениях, где такой избирательный антагонизм является благоприятным. Примеры включают терапевтические применения, где желательно антагонизировать одному или нескольким из активина (например, активина А, активина В, активина АВ, активина АС), GDF8 и GDF11 при сниженном антагонизме одного или нескольких из BMP9, BMP10 и GDF3.

Кроме того, гетеродимер ALK4:ActRIIB вызывает определенные биологические эффекты, удивительно схожие с таковыми у гомодимера ActRIIB, несмотря на различную лигандную избирательность двух комплексов. Например, гетеродимер ALK4:ActRIIB проявляет полезные анаболические эффекты в скелетной мышце и кости, а также катаболические эффекты в жировой ткани, очень схожие с таковыми у гомодимера ActRIIB-Fc. Однако, в отличие от гомодимера ActRIIB, гетеродимер ActRIIB:ALK4 демонстрирует только низкоаффинное или временное связывание с BMP9 и BMP10 и, таким образом, должен вызывать небольшое или нулевое конкурентное ингибирование процессов, опосредуемых этим лигандами, таких как ангиогенез. Эту новую избирательность можно использовать, например, при лечении пациентов, нуждающихся в стимулирующих эффектах, оказываемых на мышцу и кость, и/или ингибирующих эффектах, оказываемых на жир, но не нуждающихся в измененном ангиогенезе. Кроме того, гетеродимер ALK4:ActRIIB имеет различные положительные эффекты в модели заболевания почек на мышах, в частности, оказываемые при лечении или предотвращении повреждения почек, воспаления и фиброза. Следовательно, не желая ограничиваться конкретными механизмами действия, ожидают, что гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, а также их варианты, которые связываются с/ингибируют по меньшей мере одно или несколько из активина (например, активина А, активина В, активина АВ и активина АС), GDF8 и/или GDF11, будут эффективными средствами для содействия полезным анаболическим эффектам, оказываемым в скелетной мышце и кости, катаболическим эффектам, оказываемым в жировой ткани, и положительным эффектам, оказываемым при заболевании почек. Кроме того, ожидают, что другие антаго-

нисты (ингибиторы) или комбинации антагонистов, которые имитируют связывающие/ингибирующие свойства гетеродимеров ALK4:ActRIIB, описанных в настоящем описании, а также средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют рецепторы ALK4 и/или ActRIIB, средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют ALK4- и/или ActRIIB-связывающие лиганды, средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют медиаторы передачи сигналов ниже по каскаду реакций (например, SMAD), и/или средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют корецепторы суперсемейства TGF- β , будут иметь схожие биологические эффекты *in vivo*, включая, например, стимулирующие эффекты, оказываемые на мышцу и кость, и ингибирующие эффекты, оказываемые на жир. Эти антагонистические миметики в совокупности называют в настоящем описании "антагонистами ALK4:ActRIIB" или "ингибиторами ALK4:ActRIIB".

Следовательно, настоящее раскрытие предусматривает, отчасти, гетеромультимерные комплексы (гетеромультимеры), содержащие по меньшей мере один полипептид ALK4 и по меньшей мере один полипептид ActRIIB (гетеромультимеры ALK4:ActRIIB). Предпочтительно, полипептиды ALK4 содержат лигандсвязывающий домен рецептора ALK4, например, часть внеклеточного домена ALK4. Аналогичным образом, полипептиды ActRIIB, в целом, содержат лигандсвязывающий домен рецептора ActRIIB, например, часть внеклеточного домена ActRIIB. Предпочтительно, такие полипептиды ALK4 и ActRIIB, а также получаемые из них гетеромультимеры, растворимы.

В определенных аспектах, гетеромультимер ALK4:ActRIIB содержит аминокислотную последовательность ALK4, которая по меньшей мере на 70% идентична полипептиду, который начинается в какой-либо одной из аминокислот 24-34 из SEQ ID № 9 (например, аминокислоты 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, и 34) и кончается в какой-либо одной из аминокислот 101-126 из SEQ ID № 9 (например, аминокислоты 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). Например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность, 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 34-101 из SEQ ID № 9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность, 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 24-126 из SEQ ID № 9. В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность ALK4, 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 SEQ ID № 10. В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность ALK4, 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 SEQ ID № 20.

В определенных аспектах, гетеромультимер ALK4:ActRIIB содержит аминокислотную последовательность ActRIIB, которая по меньшей мере на 70% идентична полипептиду, который начинается в какой-либо одной из аминокислот 20-29 из SEQ ID № 1 (например, аминокислоты 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, и 29) и заканчивается в какой-либо одной из аминокислот 109-134 (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 и 134) из SEQ ID № 1. Например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность, 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 из SEQ ID № 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность, 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 из SEQ ID № 1. В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность ActRIIB, 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 SEQ ID № 2. В других вариантах осуществления, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность ActRIIB, 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 SEQ ID № 3. В других вариантах осуществления, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность ActRIIB, 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 SEQ ID № 5. В других вариантах осуществления, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать аминокислотную последовательность ActRIIB, 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 SEQ ID № 6. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB не содержат полипептид ActRIIB, который содержит кислую аминокислоту (например, встречающиеся в природе аминокислоты E или D или искусственную кислую аминокислоту) в положении, соответствующем L79 из SEQ ID № 1.

Различные комбинации полипептидов ALK4 и ActRIIB, описанные в настоящем описании, также предусмотрены в отношении гетеромультимеров ALK4:ActRIIB. Например, в определенных аспектах,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID № 6.

Как раскрыто в настоящем описании, структуры гетеромультимеров ALK4:ActRIIB включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры, гетеропентамеры и гетеромультимерные комплексы более высокого порядка. См., например, фиг. 1, 2 и 8-10. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB представляют собой гетеродимеры.

В определенных аспектах полипептиды ALK4 и/или ActRIIB могут представлять собой слитые белки. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид ALK4 может представлять собой слитый белок, содержащий домен полипептида ALK4, и один или несколько доменов гетерологичных (не ALK4) полипептидов. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полипептид ActRIIB может представлять собой слитый белок, который содержит домен полипептида ActRIIB и один или несколько доменов гетерологичных (не ActRIIB) полипептидов.

Необязательно полипептиды ALK4 соединяют непосредственно (сливают) с одним или несколькими гетерологичными доменами, или промежуточная последовательность, такая как линкер, может быть расположена между аминокислотной последовательностью полипептида ALK4 и одним или несколькими гетерологичными доменами. Аналогичным образом, полипептид ActRIIB можно соединять непосредственно (сливать) с одним или несколькими гетерологичными доменами, или промежуточная последовательность, такая как линкер, может быть расположена между аминокислотной последовательностью полипептида ActRIIB и одним или несколькими гетерологичными доменами. Линкеры могут соответствовать неструктурированному участку приблизительно из 15 аминокислот на С-конце внеклеточного домена ActRIIB или ALK4 ("хвост") или они могут представлять собой искусственную последовательность между 5 и 15, 20, 30, 50, 100 или более аминокислотами, которые относительно свободны от вторичной структуры. Линкер может быть богат остатками глицина и пролина и может, например, содержать повторяющиеся последовательности из треонина/серина и глицинов. Примеры линкеров включают, но не ограничиваясь этим, последовательности TGGG (SEQ ID № 17), SGGG (SEQ ID № 18), TGGGG (SEQ ID № 15), SGGGG (SEQ ID № 16), GGGGS (SEQ ID № 58), GGGG (SEQ ID № 14) и GGG (SEQ ID № 13). В некоторых вариантах осуществления один или несколько гетерологичных доменов, которые обеспечивают желательное свойство слитых белков ALK4 и/или ActRIIB, включая, например, усовершенствованную фармакокинетику, более легкую очистку, нацеливание на конкретные ткани и т.д. Например, гетерологичный домен слитого белка может усиливать одно или несколько из стабильности *in vivo*, времени полужизни *in vivo*, захвата/введения, локализацию или распределение в ткани, формирование белковых комплексов, мультимеризацию слитого белка и/или очистку. Слитый белок ALK4 или ActRIIB может содержать Fc-домен иммуноглобулина (дикого типа или мутантный) или сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB могут содержать подпоследовательность для очистки, такую как эпитопная метка, маркер FLAG, полигистидиновую последовательность и слитую конструкцию GST.

В определенных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, описанные в настоящем описании, содержат полипептид ALK4, ковалентно или нековалентно связанный с полипептидом ActRIIB, где полипептид ALK4 содержит домен ALK4 и аминокислотную последовательность первого элемента (или второго элемента) взаимодействующей пары и полипептид ActRIIB содержит полипептид ActRIIB и аминокислотную последовательность второго элемента (или первого элемента) взаимодействующей пары. Взаимодействующие пары, описанные в настоящем описании, разрабатывают для того, чтобы содействовать димеризации или формировать мультимеры более высокого порядка. См., например, фиг. 1, 2 и 8-10. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующая пара может представлять собой какие-либо две полипептидных последовательности, которые взаимодействуют для того, чтобы формировать комплекс, в частности, гетеродимерный комплекс, несмотря на то, что в работающих вариантах осуществления также можно использовать взаимодействующую пару, которая образует гомодимерную последовательность. Первый и второй элементы взаимодействующей пары могут представлять собой асимметричную пару, что обозначает, что элементы пары предпочтительно ассоциируют друг с другом вместо самоассоциации (т.е., направляемые взаимодействующие пары). Соответственно, первый и второй элементы асимметричной взаимодействующей пары могут ассоциировать для того, чтобы формировать гетеродимерный комплекс. Альтернативно, взаимодействующая пара может быть ненаправляемой, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения и, таким образом, могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. Соответственно, первый и второй элементы ненаправляемой взаимодействующей пары могут ассоциировать для того, чтобы формировать гомодимерный комплекс или гетеродимерный комплекс. Необязательно, первый элемент пары взаимодействующего действия (например, асимметричной пары или ненаправляемой взаимодействующей пары) ассоциирует ковалентно со вторым элементом взаимодействующей пары. Необязательно, первый элемент пары взаимодействующего действия (например, асимметричной пары или ненаправляемой взаимодействующей пары) ассоциирует нековалентно со вторым элементом взаимодействующей пары. Необязательно, первый элемент пары взаимодействующего действия (например, асимметричной пары или ненаправляемой взаимодействующей пары) ассоциирует как через ковалентные, так и через нековалентные механизмы со вторым элементом.

том взаимодействующей пары.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды ALK4 представляют собой слитые белки, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полипептиды ActRIIB представляют собой слитые белки, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина. Традиционные Fc слитые белки и антитела представляют собой примеры ненаправляемых взаимодействующих пар, тогда как различные сконструированные Fc-домены разработаны в качестве асимметричных взаимодействующих пар [Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Следовательно, первый элемент и/или второй элемент взаимодействующей пары, описанные в настоящем описании, могут содержать константный домен иммуноглобулина, включая, например, Fc часть иммуноглобулина. Например, первый элемент взаимодействующей пары может содержать аминокислотную последовательность, которую извлекают из Fc-домена иммуноглобулина 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, добавлений и/или замен), которые содействуют формированию гетеромультимера ALK4:ActRIIB. Например, первый элемент взаимодействующей пары может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична какой-либо одной из SEQ ID №№ 23-37. Аналогичным образом, второй элемент взаимодействующей пары может содержать аминокислотную последовательность, которую извлекают 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, добавлений и/или замен), которые содействуют формированию гетеромультимера ALK4:ActRIIB. Например, второй элемент взаимодействующей пары может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична какой-либо одной из SEQ ID №№ 23-37. В некоторых вариантах осуществления первый элемент и второй элемент взаимодействующей пары содержат Fc-домены, извлекаемые из иммуноглобулина одного и того же класса или субтипа. В других вариантах осуществления первый элемент и второй элемент взаимодействующей пары содержат Fc-домены, извлекаемые из иммуноглобулинов различных классов или субтипов. В некоторых вариантах осуществления гетеродимер ALK4:ActRIIB содержит i) полипептид ALK4, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 44, и ii) полипептид ActRIIB, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 41. В других вариантах осуществления гетеродимер ALK4:ActRIIB содержит i) полипептид ALK4, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 48, и ii) полипептид ActRIIB, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 46.

Необязательно, первый элемент и/или второй элемент взаимодействующей пары (например, асимметричной пары или ненаправляемой взаимодействующей пары) содержит модифицированный константный домен иммуноглобулина, включая, например, модифицированную Fc часть иммуноглобулина. Например, белковые комплексы по раскрытию могут содержать первую модифицированную Fc часть IgG, которая содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, 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 №№ 23-37, и вторую модифицированную Fc часть IgG, которая может представлять собой то же самое или отличаться от аминокислотной последовательности первой модифицированной Fc части IgG, которая содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, 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 №№ 23-37. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB содержат: а) ALK4 (или ActRIIB) слитый белок, который содержит домен иммуноглобулина, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 23, где необязательно домен иммуноглобулина содержит положительно заряженную аминокислоту (например, К, R или H) в положениях, соответствующих остаткам 134 и 177 из SEQ ID № 23, и где, кроме того, необязательно домен иммуноглобулина не содержит положительно заряженную аминокислоту (например, К, R или H) в положении, соответствующем остатку 225 из SEQ ID № 23, и b) ActRIIB (или ALK4) слитый белок, который содержит домен иммуноглобулина, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 24, где необязательно домен иммуноглобулина содержит отрицательно заряженную (например, D или E) аминокислоту в положениях, соответствующих остаткам 170 и 187 из SEQ ID № 24, и где, кроме того, необязательно домен иммуноглобулина содержит положительно заряженную аминокислоту (например, K, R или H) в положении, соответствующем остатку 225 из SEQ ID № 24. В других вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB содержат: а) ALK4 (или ActRIIB) слитый белок, который содержит домен иммуноглобулина, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 27, где необязательно домен иммуноглобулина содержит С в положении, соответствующем остатку 132 из SEQ ID № 27 и W в положении, соответствующем остатку 144 из SEQ ID № 27, и где, кроме того, необязательно домен иммуноглобулина не содержит положительно заряженную аминокислоту (например, K, R или H) в положении, соответствующем остатку 225 из SEQ ID № 27, и б) ActRIIB (или ALK4) слитый белок, который содержит домен иммуноглобулина, который содержит, состоит по существу из 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 SEQ ID № 28, где необязательно домен иммуноглобулина содержит S в положении, соответствующем остатку 144 из SEQ ID № 28, A в положении, соответствующем остатку 146 из SEQ ID № 28, и V в положении, соответствующем остатку 185 из SEQ ID № 28, и где, кроме того, необязательно домен иммуноглобулина не содержит положительно заряженную аминокислоту (например, K, R или H) в положении, соответствующем остатку 225 из SEQ ID № 28.

В определенных аспектах гетеромультимер ALK4:ActRIIB содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ActRIIB, 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 SEQ ID № 39. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимер ALK4:ActRIIB содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ActRIIB, 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 SEQ ID № 41. В определенных аспектах, гетеромультимер ALK4:ActRIIB содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ALK4, 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 SEQ ID № 42. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимер ALK4:ActRIIB содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ALK4, 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 SEQ ID № 44. Различные комбинации ALK4 и ActRIIB слитых полипептидов, описанных в настоящем описании, также предусмотрены в отношении гетеромультимеров ALK4:ActRIIB. Например, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимер ALK4:ActRIIB может содержать а) полипептид, который содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ALK4, 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 SEQ ID № 44; и б) полипептид, который содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ActRIIB, 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 SEQ ID № 41. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимер ALK4:ActRIIB может содержать а) полипептид, который содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ALK4, 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 SEQ ID № 48; и б) полипептид, который содержит или состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности ActRIIB, 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 SEQ ID № 46.

Необязательно, полипептид ALK4 и/или ActRIIB содержит один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из: гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидным фрагментом, и аминокислоты, конъюгированной с органическим средством для получения производных. Полипептиды ALK4 и/или ActRIIB могут содержать по меньшей мере один N-связанный сахар и могут содержать два, три или больше N-связанных Сахаров. Такие полипептиды также могут содержать O-связанные сахара. Полипептиды ALK4 и/или ActRIIB можно получать в различных клеточных линиях, которые гликозилируют белок таким образом, который подходит для использования у пациентов, включая сконструированные клетки насекомых или дрожжей и клетки млекопитающих, такие как клетки COS, клетки CHO, клетки HEK и клетки NSO. В некоторых вариантах осуществления полипептид ALK4 и/или ActRIIB является гликозилированным и имеет паттерн гликозилирования, получаемый от клеточной линии яичника китайского хомяка. Предпочтительно гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB по раскрытию показывают время полужизни в сыворотке по меньшей мере 4, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч у млекопитающего (напри-

мер, мышцы или человека). Необязательно, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут показывать время полужизни в сыворотке по меньшей мере 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25 или 30 суток у млекопитающих (например, мышцы или человека).

В определенных аспектах, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию связываются с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β . Необязательно гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с одним или несколькими из этих лигандов с K_D меньше чем или равной 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} М. Например, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином В. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином А. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином АВ. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином С. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином АС. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином ВС. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином ВС. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином ВЕ. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF11. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF8. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с BMP6. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF3. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с BMP10. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB не связываются с, или по существу не связываются с, BMP9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активином В с более высокой аффинностью по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF3 с более низкой аффинностью по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с BMP10 с более низкой аффинностью по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с BMP9 с более низкой аффинностью по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB.

В целом, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию антагонизируют (ингибируют) одну или несколько активностей по меньшей мере одного лиганда суперсемейства TGF- β , и такие изменения активности можно измерять с использованием различных анализов, известных в данной области, включая, например, анализ на основе клеток, такой как те, которые описаны в настоящем описании. В определенных аспектах, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB можно использовать для того, чтобы ингибировать передачу сигнала (например, передачу сигнала Smad 2/3 и/или Smad 1/5/8), опосредованную одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β , например, в анализе на основе клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина А в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина В в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина АВ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина С в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина АС в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина ВС в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина ВЕ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина АЕ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала активина СЕ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала GDF11 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала GDF8 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала BMP6 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала GDF3 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB ингибируют передачу сигнала BMP10 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB не ингибируют, или по существу не ингибируют, передачу сигнала BMP9 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более сильными ингибиторами передачи сигнала активина В в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления

гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более слабыми ингибиторами передачи сигнала GDF3 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более слабыми ингибиторами передачи сигнала BMP10 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более слабыми ингибиторами передачи сигнала BMP9 в анализе на основе клеток.

Любые из гетеромультимеров ALK4:ActRIIB, а также, антагонистов ALK4:ActRIIB, описанных в настоящем описании, можно формулировать в качестве фармацевтического препарата (композиций). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты содержат фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтический препарат предпочтительно не содержит пирогенов (то есть, не содержит пирогенов в той степени, в которой этого требуют нормы контроля качества продуктов для терапевтического использования). Фармацевтический препарат также может содержать одно или несколько дополнительных соединений, таких как соединение, которое используют для лечения нарушения/состояния, описанного в настоящем описании. В целом, фармацевтические препараты гетеромультимеров ALK4:ActRIIB по существу не содержат гомомультимеры ALK4 и/или ActRIIB. Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты гетеромультимеров ALK4:ActRIIB содержат приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% гомомультимеров ALK4. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты гетеромультимеров ALK4:ActRIIB содержат приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% гомомультимеров ActRIIB.

В определенных аспектах, раскрытие предусматривает нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид ALK4 или ActRIIB, как раскрыто в настоящем описании. Например, нуклеиновая кислота ActRIIB может содержать, состоять по существу из или состоять из нуклеиновой кислоты, 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 последовательности 73-396 из SEQ ID № 7 или той, которая образует гибрид при строгих условиях с комплементом нуклеотидов 73-396 из SEQ ID № 7. Такая нуклеиновая кислота может быть той, которая содержит последовательность из SEQ ID №№ 8 или 40. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты ActRIIB содержат, состоят по существу из или состоят из нуклеотидной 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 какой-либо одной из SEQ ID №№ 7, 8 и 40. Аналогичным образом, нуклеиновая кислота ALK4 может содержать, состоять по существу из или состоять из нуклеиновой кислоты, 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 последовательности 70-378 из SEQ ID № 11 или той, которая образует гибрид при строгих условиях с комплементом нуклеотидов 70-378 из SEQ ID № 11. Такая нуклеиновая кислота ALK4 может быть той, которая содержит последовательность из SEQ ID №№ 12, 22 или 43. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота ALK4 содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной 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 какой-либо одной из SEQ ID №№ 11, 12, 21, 22 и 43.

В определенных аспектах, настоящее раскрытие предусматривает последовательность нуклеиновых кислот, содержащую кодирующую последовательность для и полипептида ALK4 и кодирующую последовательность для полипептида ActRIIB. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по раскрытию а) содержат, состоят по существу из или состоят из нуклеотидной 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 какой-либо одной из SEQ ID №№ 11, 12, 21, 22 и 43, и b) содержат, состоят по существу из или состоят из нуклеотидной 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 какой-либо одной из SEQ ID №№ 7, 8 и 40. Предпочтительно, нуклеиновые кислоты ALK4 и/или ActRIIB представляют собой выделенные и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем описании, могут быть функционально связаны с промотором для экспрессии. Настоящее раскрытие, кроме того, предусматривает векторы, содержащие такие полинуклеотиды ALK4 и/или ActRIIB, а также клетки (например, клетки CHO), предпочтительно клетки, выделенные у человека или позвоночного другого вида, которые содержат такие полинуклеотиды ALK4 и/или ActRIIB, а также векторы, содержащие такие полинуклеотиды ALK4 и/или ActRIIB.

В определенных аспектах, полипептиды ALK4 и/или полипептиды ActRIIB можно экспрессировать в клеточной линии млекопитающего, необязательно клеточной линии, которая подходящим образом опосредует естественное гликозилирование белка ActRIIB или ALK4 с тем, чтобы уменьшать вероятность неблагоприятного иммунного ответа у пациента (включая возможность для ветеринарных пациентов). Клеточные линии человека и клеточные линии CHO успешно использовали, и ожидают, что можно использовать другие обычные экспрессирующие векторы млекопитающих. Таким образом раскрытие предусматривает культивируемые клетки, содержащие какие-либо из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании. Такие клетки могут представлять собой клетки млекопитающих, включая клетки

CHO, клетки NSO, клетки HEK и клетки COS. Другие клетки можно выбирать в зависимости от биологического вида предполагаемого пациента. Другие клетки описаны в настоящем описании. Культивируемые клетки понимают как обозначение клеток, поддерживаемых в лаборатории или других искусственных условиях (например, замороженными или в средах), а не части живого организма.

В определенных аспектах, раскрытие предусматривает способы получения какого-либо из полипептидов ALK4 и ActRIIB, описанных в настоящем описании, а также гетеромультимерных комплексов ALK4:ActRIIB, содержащих такие полипептиды. Такой способ может включать экспрессию какой-либо из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, в подходящей клетке (например, клетке CHO или клетке COS). Например, в некоторых вариантах осуществления способ получения гетеромультимера, содержащего полипептид ALK4 и полипептид ActRIIB, включает: а) культивирование клетки в условиях, подходящих для экспрессии полипептида ALK4 и полипептида ActRIIB, где клетка содержит полинуклеотид ALK4 и полинуклеотид ActRIIB; и б) извлечение гетеромультимера, экспрессированного таким образом. Альтернативно, способ получения гетеромультимера, содержащего полипептид ALK4 и полипептид ActRIIB, может включать: а) культивирование первой клетки в условиях, подходящих для экспрессии полипептида ALK4, где первая клетка содержит полинуклеотид ALK4; б) извлечение полипептида ALK4, экспрессированного таким образом; в) культивирование второй клетки в условиях, подходящих для экспрессии полипептида ActRIIB, где вторая клетка содержит полинуклеотид ActRIIB; г) извлечение полипептида ActRIIB, экспрессированного таким образом; д) объединение извлеченного полипептида ALK4 и извлеченного полипептида ActRIIB в условиях, подходящих для формирования гетеромультимера ALK4:ActRIIB; и е) извлечение гетеромультимера ALK4:ActRIIB. В определенных вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB экспрессируют с использованием лидерной последовательности TPA (например, SEQ ID № 38). В определенных вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB экспрессируют в клетке CHO. Полипептиды ALK4 и ActRIIB, описанные в настоящем описании, а также их белковые комплексы, можно извлекать в виде неочищенных, частично очищенных или высокоочищенных фракции с использованием каких-либо из общеизвестных способов получения белка из клеточных культур. В целом, такие способы ведут к гетеромультимерам ALK4:ActRIIB, которые по существу не содержат гомомультимеры ALK4 и/или ActRIIB. Например, в некоторых вариантах осуществления способы получения гетеромультимера ALK4:ActRIIB ведут приблизительно меньше чем к 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% гомомультимеров ALK4. В некоторых вариантах осуществления способы получения гетеромультимеров ALK4:ActRIIB ведут приблизительно меньше чем к 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% гомомультимеров ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления способы получения гетеромультимеров ALK4:ActRIIB ведут приблизительно меньше чем к 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% гомомультимеров ALK4 и приблизительно меньше чем к 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% гомомультимеров ActRIIB.

Раскрытие, кроме того, предусматривает способы и антагонисты ALK4:ActRIIB (например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB) для использования в лечении или предотвращении различных ALK4:ActRIIB-ассоциированных заболеваний и состояний, связанных, например, с мышцей, костью, жиром, красными клетками крови и другими тканями. Такие заболевания и нарушения включают, но не ограничиваясь этим, нарушения, связанные с потерей мышц или недостаточным ростом мышц (например, атрофией мышц; мышечной дистрофией, включая мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера и плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию; амиотрофическим боковым склерозом; и кахексией) и нарушения, связанные с нежелательным увеличением массы (например, ожирением, диабетом 2-го типа или инсулинонезависимым сахарным диабетом (NIDDM), сердечно-сосудистым заболеванием, гипертонией, остеоартритом, инсультом, проблемами с дыханием и заболеваниями желчного пузыря). В некоторых вариантах осуществления антагонисты ALK4:ActRIIB (например, гетеромультимеры) можно использовать для снижения содержания жира в организме или снижения скорости увеличения содержания жира в организме у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления антагонисты ALK4:ActRIIB (например, гетеромультимеры) можно использовать для того, чтобы снижать уровни холестерина и/или триглицеридов у пациента. В некоторых вариантах осуществления антагонисты ALK4:ActRIIB (например, гетеромультимеры) можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать фиброз или фиброз-ассоциированное нарушение или состояние (такое как почечная недостаточность, хроническое заболевание почек, кистозный фиброз и миелофиброз).

Раскрытие, кроме того, предусматривает способы и антагонисты ALK4:ActRIIB для использования при лечении или предотвращении различных ALK4:ActRIIB-ассоциированных заболеваний и состояний, связанных, например, с почками. Такие заболевания или состояния включают, например, хроническое почечное заболевание или недостаточность, острое почечное заболевание или недостаточность, пациенты, которые имеют заболевание почек 1 стадии, пациенты, которые имеют заболевание почек 2 стадии, пациенты, которые имеют заболевание почек 3 стадии, пациенты, которые имеют заболевание почек 4 стадии, пациенты, которые имеют заболевание почек 5 стадии, недиабетические заболевания почек, гломерулонефрит, интерстициальный нефрит, диабетические заболевания почек, диабетическую нефропатию, гломерулосклероз, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, фиброз почек, синдром Альпорта,

IDDM нефрит, мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит, мембранопрлиферативный гломерулонефрит, серповидный гломерулонефрит, интерстициальный фиброз почек, фокально-сегментарный гломерулосклероз, мембранозную нефропатию, болезнь минимальных изменений, слабоиммунный быстро прогрессирующий гломерулонефрит, IgA нефропатию, поликистозную болезнь почек, болезнь Дента, нефроцитиноз, нефрит Хеймана, аутосомную доминантную поликистозную болезнь почек (взрослых), аутосомную рецессивную поликистозную болезнь почек (детей), острое повреждение почек, нефротический синдром, почечную ишемию, заболевания или нарушения подоцитов, протеинурию, заболевания клубочков, мембранозный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулонефрит, предэклампсию, эклампсию, повреждения почек, коллагеновые заболевания сосудов, доброкачественную ортостатическую (постуральную) протеинурию, IgM нефропатию, мембранозную нефропатию, саркоидоз, сахарный диабет, повреждение почки лекарственными средствами, болезнь Фабри, аминокислотурию, синдром Фалькони, гипертонический нефросклероз, интерстициальный нефрит, серповидно-клеточную болезнь, гемоглобинурию, миоглобинурию, гранулематоз Вегенера, болезнь накопления гликогена I типа, хроническое заболевание почек, хроническую почечную недостаточность, низкий уровень клубочковой фильтрации (GFR), нефроангиосклероз, волчаночный нефрит, ANCA-положительный слабоиммунный серповидный гломерулонефрит, хроническую аллотрансплантатную нефропатию, нефротоксичность, почечную токсичность, некроз почки, повреждение почки, повреждение клубочков и канальцев, нарушение функции почек, нефритический синдром, острую почечную недостаточность, хроническую почечную недостаточность, нарушение функции проксимальных канальцев, острое отторжение трансплантата почки, хроническое отторжение трансплантата почки, не IgA мезангиопрлиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит, васкулиты с вовлечением почек какого-либо типа, любое наследственное почечное заболевание, какой-либо интерстициальный нефрит, недостаточность трансплантата почки, злокачественную опухоль почки, почечное заболевание, связанное с другими состояниями (например, гипертонией, диабетом и аутоиммунным заболеванием), болезнь Дента, нефроцитиноз, нефрит Хеймана, первичное почечное заболевание, коллапсирующую гломерулопатию, болезнь плотного осадка, ассоциированный с криоглобулинемией гломерулонефрит, болезнь Геноха-Шонлейна, постинфекционный гломерулонефрит, бактериальный эндокардит, микроскопический полиангиит, синдром Черджа-Строса, гломерулонефрит, опосредованный антителами против GBM, амилоидоз, болезнь отложения моноклональных иммуноглобулинов, фибриллярный гломерулонефрит, иммунотактоидную гломерулопатию, ишемическое повреждение канальцев, индуцированный медикаментозным лечением канальцево-интерстициальный нефрит, токсический канальцево-интерстициальный нефрит, инфекционный канальцево-интерстициальный нефрит, бактериальный пиелонефрит, вирусный инфекционный канальцево-интерстициальный нефрит, который является результатом полиомавирусной инфекции или ВИЧ-инфекции, метаболически индуцированное канальцево-интерстициальное заболевание, смешанное заболевание соединительной ткани, канальцевую нефропатию, кристаллическую нефропатию, которая может быть результатом отложения кристаллов, вызванного уратами или оксалатами или лекарственными средствами, острое клеточное отторжение канальцево-интерстициального аллотрансплантата, опухолевую инфильтрационную болезнь, которая является результатом лимфомы или посттрансплантационного лимфопрлиферативного заболевания, обструктивное заболевание почек, заболевание сосудов, тромботическую микроангиопатию, нефроангиосклероз, атероземболическую болезнь, смешанное заболевание соединительной ткани, узелковый полиартериит, индуцированное ингибитором кальциневрина заболевание сосудов, острое клеточное отторжение сосудистого аллотрансплантата, острое гуморальное отторжение аллотрансплантата, раннее снижение функции почек (ERFD), терминальное почечное заболевание (ESRD), тромбоз почечных вен, острый канальцевый некроз, почечную окклюзию, острый интерстициальный нефрит, устоявшуюся хроническую почечную недостаточность, стеноз почечной артерии, ишемическую нефропатию, уремию, индуцированный лекарственным средством и токсином хронический тубулоинтерстициальный нефрит, рефлюксную нефропатию, камни в почках, синдром Гудпасчера, нормоцитарную нормохромную анемию, почечную анемию, диабетическую хроническую почечную недостаточность, связанное с IgG4 заболевание, синдром фон Гиппеля-Линдау, туберозный склероз, нефронофтиз, мозговое кистозное почечное заболевание, почечноклеточную карциному, аденокарциному, нефробластому, лимфому, лейкоз, нарушение гипосиалирования, хроническую циклоспориновую нефропатию, реперфузионное повреждение почек, дисплазию почек, азотемию, билатеральную закупорку артерий, острую мочекислотную нефропатию, гиповолемию, острую билатеральную обструктивную уропатию, гиперкальциемическую нефропатию, гемолитический уремический синдром, острую задержку мочи, озлокачествленный нефросклероз, послеродовой гломерулосклероз, склеродермию, болезнь антител против GBM, не являющееся синдромом Гудпасчера, микроскопический узелковый полиартериит, аллергический гранулематоз, острый лучевой нефрит, постстрептококковый гломерулонефрит, макроглобулинемию Вальденстрема, анальгезическую нефропатию, артериовенозную фистулу, артериовенозный трансплантат, диализ, эктопическую почку, спонгиозную почку, нефрогенную остеоидиофилию, единственную почку, гидронефроз, макроальбуминурию, уремию, гематурию, гиперлипидемию, гипоальбуминемию, липидурию, ацидоз и гиперкалиемию. В некоторых вариантах осуществления, кроме того, раскрытие предусматривает способы и антагонисты ALK4:ActRIIB для использования в задержке или пре-

дотвращении прогрессирования: почечного заболевания от стадии 1 до стадии 2, почечного заболевания от стадии 2 до стадии 3, почечного заболевания от стадии 3 до стадии 4 или почечного заболевания от стадии 4 до стадии 5. В некоторых вариантах осуществления, кроме того, раскрытие предусматривает способы и антагонисты ALK4:ActRIIB для использования в предотвращении или уменьшения воспаления почек. В некоторых вариантах осуществления, кроме того, раскрытие предусматривает способы и антагонисты ALK4:ActRIIB для использования в предотвращении или снижении повреждения почки. В некоторых вариантах осуществления, кроме того, раскрытие предусматривает способы и антагонисты ALK4:ActRIIB для использования в предотвращении или снижении фиброза почек.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А и 1В представлены два схематических примера гетеромерных белковых комплексов, содержащих полипептиды рецептора I типа и рецептора II типа. На фиг. 1А изображен гетеродимерный белковый комплекс, который содержит один слитый полипептид рецептора I типа и один слитый полипептид рецептора II типа, которые могут собираться ковалентно или нековалентно через мультимеризационный домен, содержащийся в каждой полипептидной цепи. Два собранных мультимеризационных домена составляют взаимодействующую пару, которая может быть или направляемой или ненаправляемой. На фиг. 1В изображен гетеротетрамерный белковый комплекс, который содержит два гетеродимерных комплекса, как изображено на фиг. 1А. Можно предполагать комплексы более высокого порядка.

На фиг. 2 представлен схематический пример гетеромерного белкового комплекса, который содержит полипептид рецептора I типа (обозначенный как "I") (например, полипептид, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK4 человека или других биологических видов, такому как те, которые описаны в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48) и полипептид рецептора II типа (обозначенный как "II") (например, полипептид, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIB человека или других биологических видов, такому как те, которые описаны в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46). В проиллюстрированных вариантах осуществления полипептид рецептора I типа представляет собой часть слитого полипептида, который содержит первый элемент взаимодействующей пары ("C₁"), и полипептид рецептора II типа представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("C₂"). В каждом слитом полипептиде линкер может быть расположен между полипептидом рецептора I типа или типа II и соответствующим элементом взаимодействующей пары. Первый и второй элементы взаимодействующей пары могут представлять собой направляемую (асимметричную) пару, что обозначает, что элементы пары ассоциируют предпочтительно друг с другом вместо самоассоциации, или взаимодействующая пара может быть ненаправляемой, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. Традиционные Fc слитые белки и антитела представляют собой примеры ненаправляемых взаимодействующих пар, тогда как различные сконструированные Fc-домены разработаны в качестве направляемых (асимметричных) взаимодействующих пар [например, Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106].

На фиг. 3 представлено выравнивание внеклеточных доменов ActRIIA человека (SEQ ID № 49) и ActRIIB человека (SEQ ID № 2), где остатки, которые, как установлено в настоящем описании на основании сложного анализа множества кристаллических структур ActRIIB и ActRIIA, непосредственно контактируют с лигандом, помечены рамками.

На фиг. 4 представлено множественное выравнивание последовательностей различных белков-предшественников ActRIIB позвоночных без их внутриклеточных доменов (SEQ ID №№ 50-55, соответственно) белка-предшественника ActRIIA человека без его внутриклеточного домена (SEQ ID № 56) и консенсусного белка-предшественника ActRII (SEQ ID № 57).

На фиг. 5 представлено множественное выравнивание последовательностей Fc-доменов из изоформ IgG человека с использованием Clustal 2.1. Шарнирные области обозначены штриховым подчеркиванием. Двойное подчеркивание обозначает примеры положений, сконструированных в Fc IgG1 для того, чтобы содействовать асимметричному образованию пар цепей, и соответствующих положений по отношению к другим изоформам IgG2, IgG3 и IgG4.

На фиг. 6 представлен сравнительные данные о связывании лигандов для гетеродимерного белкового комплекса ALK4-Fc:ActRIIB-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK4-Fc. Для каждого белкового комплекса лиганды ранжированы по k_{off} , кинетической константе, которая хорошо коррелирует с ингибированием передачи сигнала лиганда, и перечислены в нисходящем порядке по аффинности связывания (лиганды, связывающиеся наиболее прочно, перечислены сверху). Слева желтая, красная, зеленая и синяя линии показывают величину константы скорости диссоциации. Сплошные черные линии показывают лиганды, связывание которых с гетеродимером усилено или не изменено по сравнению с гомодимером, тогда как штриховые красные линии показывают снижение связывания по сравнению с гомодимером. Как показано, гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc демонстрирует усиленное связывание с активинем В по сравнению с любым гомодимером, сохраняет сильное связывание

вание с активином А, GDF8 и GDF11, как наблюдали при использовании гомодимера ActRIIB-Fc, и демонстрирует по существу сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3. Подобно гомодимеру ActRIIB-Fc, гетеродимер сохраняет связывание с BMP6 на промежуточном уровне.

На фиг. 7 представлено множественное выравнивание последовательностей внеклеточных доменов ALK4, полученных у различных видов позвоночных (SEQ ID №№ 59-65).

На фиг. 8A-8D представлены схематические примеры гетеромерных белковых комплексов, содержащих полипептид ALK4 (например полипептид, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK4 человека или другого биологического вида, такому как тот, который описан в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48), и полипептид ActRIIB (например, полипептид который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIB человека или другого биологического вида, такому как тот, который описан в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46).

В проиллюстрированных вариантах осуществления полипептид ALK4 (слева направо) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит первый элемент взаимодействующей пары ("C₁"), и полипептид ActRIIB представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("C₂"). Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелых цепей и/или легких цепей иммуноглобулинов, усечения и их варианты, такие как те, которые описаны в настоящем описании [например, Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. В каждом слитом полипептиде, линкер может быть расположен между полипептидом ALK4 или ActRIIB и соответствующим элементом взаимодействующей пары. Первый и второй элементы взаимодействующей пары могут быть ненаправляемыми, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения, и они могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. См. фиг. 8A. Альтернативно, взаимодействующая пара может представлять собой направляемую (асимметричную) пару, что обозначает, что элементы пары ассоциируют предпочтительно друг с другом вместо самоассоциации. См. фиг. 8B. Можно предполагать комплексы более высокого порядка. См. фиг. 8C и 8D.

На фиг. 9A-9G представлены схематические примеры гетеромерных белковых комплексов, содержащих два полипептида ALK4 (например, полипептида, которые независимо по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны внеклеточному домену белка ALK4 человека или другого биологического вида, такому как те, которые описаны в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48), и два полипептида ActRIIB (например, два полипептида, которые независимо по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны внеклеточному домену белка ActRIIB человека или другого биологического вида, такому как те, которые описаны в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46).

В проиллюстрированном варианте осуществления 9A, первый полипептид ALK4 (слева направо) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит первый элемент взаимодействующей пары ("C₁") и дополнительно содержит дополнительный первый элемент взаимодействующей пары ("A₁"); и второй полипептид ALK4 представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("C₂") и дополнительно содержит первый элемент взаимодействующей пары ("A₂"). Первый полипептид ActRIIB (слева направо) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("B₁"); и второй полипептид ActRIIB представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("B₂"). A₁ и A₂ могут представлять собой одно и то же или различное; B₁ и B₂ могут представлять собой одно и то же или различное, и C₁ и C₂ могут представлять собой одно и то же или различное. В каждом слитом полипептиде, линкер может быть расположен между полипептидом ALK4 или ActRIIB и соответствующим элементом взаимодействующей пары, а также между взаимодействующими парами. На фиг. 9A представлен пример ассоциации ненаправляемых взаимодействующих пар, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности.

В проиллюстрированном варианте осуществления 9B, первый полипептид ActRIIB (слева направо) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит первый элемент взаимодействующей пары ("C₁") и дополнительно содержит дополнительный первый элемент взаимодействующей пары ("A₁"); и второй полипептид ActRIIB представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("B₂"). Первый полипептид ALK4 (слева направо) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("B₁"); и второй полипептид ALK4 представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("C₂") и дополнительно содержит первый элемент взаимодействующей пары ("A₂"). В каждом слитом полипептиде, линкер может быть расположен между полипептидом ALK4 или ActRIIB и соответствующим элементом взаимодействующей пары, а также между взаимодействующими парами. На фиг. 9B представлен пример ассоциации направляемых (асимметричных) взаи-

модействующих пар, что обозначает, что элементы пары ассоциируют предпочтительно друг с другом вместо самоассоциации.

Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелых цепей и/или легких цепей иммуноглобулинов, их усечения и варианты, как раскрыто в настоящем описании [например, Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Можно предполагать комплексы более высокого порядка. См. фиг. 9C-9F. Используя схожие способы (в частности, те, в которых используют иммуноглобулины легких и/или тяжелых цепей, их усечения или варианты), взаимодействующие пары можно использовать для того, чтобы получать гетеродимеры ALK4:ActRIIB, которые походят на комплексы Fab и F(ab')₂ антител [например, Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. См. фиг. 9G.

На фиг. 10A и 10B представлены схематические примеры гетеромерного белкового комплекса, который содержит полипептид ALK4 (например, полипептид, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен внеклеточному домену белка ALK4 человека или другого биологического вида, как раскрыто в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48), полипептид ActRIIB (например, полипептид, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен внеклеточному домену белка ActRIIB человека или других биологических видов, такому как те, которые описаны в настоящем описании, например, SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46), и лигандсвязывающий домен антитела (например, лигандсвязывающий домен, полученный из антитела, которое связывается с одним или несколькими ALK4:ActRIIB-связывающими лигандами). В проиллюстрированных вариантах осуществления, полипептид ALK4 представляет собой часть слитого полипептида, который содержит первый элемент взаимодействующей пары ("C₁"), и дополнительно содержит дополнительный первый элемент взаимодействующей пары ("A₁"). Полипептид ActRIIB представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("B₁"). Полипептид переменной тяжелой цепи (V_H) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("C₂"), и дополнительно содержит первый элемент взаимодействующей пары ("A₂"). Полипептид переменной тяжелой цепи (V_L) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("B₂"). В каждом слитом полипептиде, линкер может быть расположен между полипептидом ALK4 или ActRIIB и соответствующим элементом взаимодействующей пары, между взаимодействующими парами и между полипептидами V_H и V_L и элементом взаимодействующей пары. A₁ и A₂ могут представлять собой одно и то же или различное; B₁ и B₂ могут представлять собой одно и то же или различное, и C₁ и C₂ могут представлять собой одно и то же или различное. Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары константных тяжелых цепей и/или легких цепей иммуноглобулинов, их усечения и варианты, как раскрыто в настоящем описании [например, Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. На фиг. 10A представлен пример ассоциации направляемой (асимметричной) взаимодействующей пары, что обозначает, что элементы пары ассоциируют предпочтительно друг с другом вместо самоассоциации. На фиг. 10B представлен пример ассоциации ненаправляемых взаимодействующих пар, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности.

Такие комплексы антитело-ALK4:ActRIIB можно использовать в ситуациях, когда желательно дополнительно связывать/антагонизировать агент, который не является лигандом ALK4:ActRIIB. Альтернативно, такие комплексы антитело-ALK4:ActRIIB можно использовать в ситуациях, когда желательно дополнительно усиливать связывание/антагонизм лиганда ALK4:ActRIIB. Например, как продемонстрировано в примерах в настоящем описании, активин В, активин А, GDF11 и GDF8 связываются с высокой аффинностью с гетеродимером ALK4:ActRIIB. Кроме того, BMP6 связывается с гетеродимерами ALK4:ActRIIB, но с более низкой аффинностью. В определенных ситуациях, когда желательно антагонизировать активность BMP6 в дополнение к одному или нескольким из лигандов, связывающих высокой аффинностью (например, активин В, активин А, GDF11 и GDF8), может происходить вытеснение BMP6 при связывании с гетеродимером ALK4:ActRIIB. В таких ситуациях добавление BMP6-связывающего домена антитела к гетеромультимерному комплексу ALK4:ActRIIB усовершенствует способность таких белковых комплексов антагонизировать BMP6 в дополнение к одному или нескольким из активина В, активина А, GDF11 и GDF8.

На фиг. 11 представлены схематические примеры полипептидов ALK4:ActRIIB с одной ловушкой. Полипептиды ALK4:ActRIIB с одной ловушкой могут содержать несколько доменов ALK4 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 или больше доменов), имеющие одинаковые или различные последовательности, и несколько доменов ActRIIB (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 или больше доменов), имеющих одинаковые или различные последовательности. Эти домены ALK4 и ActRIIB можно располагать в любом порядке, и они могут содержать один или несколько положений линкерных доменов между одним или несколькими из доменов ALK4 и ActRIIB. Такие ловушки для лигандов можно использовать в качестве терапевтических средства для того, чтобы лечить или предотвращать заболевания или состояния, описанные в настоящем описании.

На фиг. 12A-12D представлены схематические примеры мультимерного белкового комплекса, который содержит по меньшей мере один одноцепочечный полипептиды ALK4:ActRIIB с ловушкой. В проиллюстрированных вариантах осуществления 12A и 12B, первый одноцепочечный полипептид ALK4:ActRIIB с ловушкой (слева направо) представляет собой часть слитого полипептида, который содержит первый элемент взаимодействующей пары ("C₁"); и второй одноцепочечный полипептид ALK4:ActRIIB с ловушкой представляет собой часть слитого полипептида, который содержит второй элемент взаимодействующей пары ("C₂"). C₁ и C₂ могут представлять собой одно и то же или различное. Первый и второй одноцепочечные полипептиды ALK4:ActRIIB с ловушкой могут представлять собой одно и то же или различное. В каждом слитом полипептиде, линкер может быть расположен между одноцепочечным полипептидом ALK4:ActRIIB с ловушкой и соответствующим элементом взаимодействующей пары. Подходящие взаимодействующие пары включают, например, взаимодействующие пары тяжелых цепей и/или легких цепей иммуноглобулинов, их усечения и варианты, как раскрыто в настоящем описании [например, Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. На фиг. 12A представлен пример ассоциации ненаправляемых взаимодействующих пар, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения и могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. На фиг. 12B представлен пример ассоциации направляемых (асимметричных) взаимодействующих пар, что обозначает, что элементы пары ассоциируют предпочтительно друг с другом вместо самоассоциации. Можно предполагать комплексы более высокого порядка. Кроме того, такие одноцепочечные полипептиды ALK4:ActRIIB с ловушкой могут ассоциировать аналогичным образом, ковалентно или нековалентно, с одним или несколькими полипептидами ALK4 и/или одним или несколькими полипептидами ActRIIB. См. фиг. 12C. Также такие одноцепочечные полипептиды ALK4:ActRIIB с ловушкой могут аналогичным образом ассоциировать, ковалентно или нековалентно, с одним или несколькими лигандсвязывающими доменами антитела (например, лигандсвязывающий домен антитела, который связывается с одним или несколькими ALK4:ActRIIB-связывающими лигандами). См. фиг. 12D.

На фиг. 13 представлен сравнительные данные об IC₅₀ гетеродимера ALK4-Fc:ActRIIB-Fc/гомодимера ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc, как определяют с помощью анализа репортерного гена A-204, как раскрыто в настоящем описании. Гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc ингибирует пути передачи сигнала активина A, активина B, GDF8 и GDF11 аналогично гомодимеру ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Однако ингибирование путей передачи сигнала BMP9 и BMP10 гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc значительно снижено по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Эти данные демонстрируют, что гетеродимеры ALK4:ActRIIB являются более избирательными антагонистами активина A, активина B, GDF8 и GDF11 по сравнению с соответствующими гомодимерами ActRIIB:ActRIIB.

На фиг. 14A-14C представлены профили экспрессии генов для фиброзных генов (Col1a1, фибронектин, PAI-1, CTGF и α-SMA), воспалительных генов (TNF-α, и MCP1), генов цитокинов (TGF-β1, GF-β2, TGF-β3 и активин A), гена повреждения почек (NGAL), индуцируемого гипоксией фактора 1-α (HIF1α) и рецептор активина A (Acvtg2A) из почек мышей, которых подвергали односторонней обструкции мочеочника (UUO). Образцы из контралатеральной почки, не подвергавшейся хирургическому вмешательству, использовали в качестве контроля (Ctrl). Профили экспрессии генов получали в 17 сутки после хирургического вмешательства. Мышам вводили PBS или гомодимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc в сутки 3, 7, 10 и 14 после хирургического вмешательства. (\$) обозначает статистическое различие между UUO почками в 17 сутки у мышей, которым вводили только PBS, по сравнению с UUO почками в 17 сутки у мышей, которым вводили гомодимер ALK7-Fc:ActRIIB-Fc. (@) обозначает, что транскрипт не обнаруживали.

Подробное описание изобретения

1. Обзор.

Отчасти настоящее изобретение относится к гетеромультимерам, содержащим полипептид рецептора I суперсемейства TGF-β типа и полипептид рецептора II типа суперсемейства TGF-β, их использованию и способам получения таких гетеромультимеров. См., например, фиг. 1 и 2. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры содержат внеклеточный домен полипептида рецептора I типа суперсемейства TGF-β и внеклеточный домен полипептида рецептора II типа суперсемейства TGF-β. В частности, раскрытие предусматривает гетеромультимеры, которые содержат полипептид ALK4 и полипептид ActRIIB. Предпочтительно такие полипептиды ALK4 содержат лигандсвязывающий домен рецептора ALK4 и такие полипептиды ActRIIB содержат лигандсвязывающий домен рецептора ActRIIB. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию имеют измененный профиль/специфичность связывания лиганда суперсемейства TGF-β по сравнению с соответствующим образцом гомомультимера (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB по сравнению с гомодимером ActRIIB:ActRIIB или гомодимером ALK4:ALK4).

Суперсемейство TGF-β состоит из более чем 30 секретируемых факторов, включая TGF-β, активины, NODAL, морфогенетические белки кости (BMP), факторы роста и дифференцировки (GDF) и анти-мюллеровский гормон (AMH) [Weiss et al. (2013) *Developmental Biology*, 2(1): 47-63]. Члены суперсемейства, которых находят как у позвоночных, так и беспозвоночных, повсеместно экспрессированы в разно-

образных тканей и функционируют от самых ранних стадий развития на всем протяжении жизни животного. В действительности, белки суперсемейства TGF- β являются ключевыми медиаторами самоподдержания стволовых клеток, гастрюляции, дифференцировки, морфогенеза органов и гомеостаза зрелых тканей. В соответствии с этой повсеместной активностью, аберрантная передача сигнала суперсемейством TGF- β связана с широким диапазоном патологий человека, включая, например, аутоиммунные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, фиброзные заболевания и злокачественные опухоли.

Лиганды суперсемейства TGF- β обладают одинаковой димерной структурой, в которой центральный 3-1/2 поворот-спираль одного мономера помещается в вогнутой поверхности, сформированной посредством β -тяжами другого мономера. Большинство членов семейства TGF- β дополнительно стабилизировано посредством межмолекулярной дисульфидной связью. Эти дисульфидные связи проходят через кольцо, сформированное двумя другими дисульфидными связями, создающими то, что называют мотивом "цистеиновый узел" [Lin et al. (2006) *Reproduction* 132: 179-190; и Hinck et al. (2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870].

Передачу сигнала суперсемейства TGF- β опосредуют гетеромерные комплексы серин/треонинкиназных рецепторов I типа и II типа, которые фосфорилируют и активируют белки SMAD ниже по каскаду (например, белок SMAD 1, 2, 3, 5 и 8) при стимуляции лигандом [Massagué (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178]. Эти рецепторы I типа и II типа представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена с богатым цистеином участком, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предсказанной специфичностью серин/треонинкиназы. В целом, рецепторы I типа опосредуют передачу внутриклеточных сигналов, тогда как рецепторы II типа необходимы для связывания лигандов суперсемейства TGF- β . Рецепторы I и II типа образуют стабильный комплекс после связывания лиганда, что ведет к фосфорилированию рецепторов I типа с помощью рецепторов II типа.

Семейство TGF- β можно разделить на две филогенетические ветви на основе рецепторов I типа, которые они связывают, и белков SMAD, которые они активируют. Одна представляет собой выделенную совсем недавно ветвь, которая включает, например, TGF- β , активины, GDF8, GDF9, GDF11, BMP3 и NODAL, которые передают сигналы через рецепторы I типа, которые активируют SMAD 2 и 3 [Hinck (2012) *FEBS Letters* 586:1860-1870]. Другая ветвь включает более отдаленно родственные белки суперсемейства, например, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF1, GDF5, GDF6 и GDF7, которые передают сигналы через SMAD 1, 5 и 8.

Изоформы TGF- β являются основополагающими членами суперсемейства TGF- β , среди которых у млекопитающих известно 3 изоформы, обозначаемых как TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3. Зрелые биологически активные лиганды TGF- β выполняют функцию гомодимеров и преимущественно передают сигналы через рецептор I типа ALK5, но также обнаружено, что они дополнительно передают сигналы через ALK1 в клетках эндотелия [Goumans et al. (2003) *Mol Cell* 12(4): 817-828]. TGF- β 1 представляет собой наиболее распространенную и повсеместно экспрессированную изоформу. Известно, что TGF- β 1 играет важную роль в заживлении ран, и у мышей, экспрессирующих конститутивно активных трансген TGF- β 1, происходит развитие фиброза [Clouthier et al. (1997) *J Clin. Invest.* 100(11): 2697-2713]. TGF- β 1 также участвует в активации Т-клеток и поддержании Т-регуляторных клеток [Li et al. (2006) *Immunity* 25(3): 455-471]. Экспрессия TGF- β 2 впервые описана в клетках глиобластомы человека, и она происходит в нейронах и астроглиальных клетках эмбриональной нервной системы. Известно, что TGF- β 2 подавляет интерлейкин-2-зависимый рост Т-лимфоцитов. TGF- β 3 изначально выделили из клеточной линии рабдомиосаркомы человека, и с тех пор он обнаружен в клеточных линиях аденокарциномы легких и карциномы почки. Известно, что TGF- β 3 важен для морфогенеза неба и легких [Kubiczkova et al. (2012) *Journal of Translational Medicine* 10:183].

Активины представляют собой члены суперсемейства TGF- β , которые изначально обнаружены как регуляторы секреции фолликулостимулирующего гормона, но впоследствии описаны различные репродуктивные и нерепродуктивные роли. Существует три главных формы активинов (А, В и АВ), которые представляют собой гомо/гетеродимеры двух близко родственных субъединиц β ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, и $\beta_A\beta_B$, соответственно). Геном человек также кодирует активин С и активин Е, которые в первую очередь экспрессированы в печени, и также известны гетеродимерные формы, содержащие β_C или β_E . В суперсемействе TGF- β активины являются уникальными и многофункциональными факторами, которые могут стимулировать образование гормонов в клетках яичников и плаценты, поддерживать выживание нервных клеток, влиять на развитие клеточного цикла положительно или отрицательно, в зависимости от типа клеток, и индуцировать дифференцировку мезодермы по меньшей мере у эмбрионов амфибий [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 некоторых тканях передачу сигнала активин антагонизирует родственный ему гетеродимер, ингибин. Например, при регуляции секреции фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза, активин содействует синтезу и секреции FSH, тогда как ингибин снижает синтез и секрецию FSH. Другие белки, которые могут регулировать биологическую активность активина

и/или связываться с активином, включают фоллистатин (FS), родственный фоллистатину белок (FSRP, также известный как FLRG или FSTL3), и $\alpha 2$ -макроглобулин.

Как раскрыто в настоящем описании, средства, которые связываются с "активином А", представляют собой средства, которые специфически связываются с субъединицей β_A , или в контексте выделенной субъединицы β_A или в виде димерного комплекса (например, гомодимера $\beta_A\beta_A$ или гетеродимера $\beta_A\beta_B$). В случае гетеродимерного комплекса (например, гетеродимера $\beta_A\beta_B$), средства, которые связываются с "активином А", обладают специфичностью к эпитопам, присутствующим в субъединице β_A , но не связываются с эпитопами, присутствующими в не субъединице β_A комплекса (например, субъединице β_B комплекса). Аналогичным образом, средства, описанные в настоящем описании, которые антагонизируют (ингибируют) "активин А", представляют собой средства, которые ингибируют одну или несколько активностей, которые опосредует субъединица β_A , или в контексте выделенной субъединицы β_A или в виде димерного комплекса (например, гомодимера $\beta_A\beta_A$ или гетеродимера $\beta_A\beta_B$). В случае гетеродимеров $\beta_A\beta_B$, средства, которые ингибируют "активин А", представляют собой средства, которые специфически ингибируют одну или несколько активностей субъединицы β_A , но не ингибируют активность не субъединицы β_A комплекса (например, субъединицы β_B комплекса). Этот принцип также применим ко средствам, которые связывают и/или ингибируют "активин В", "активин С" и "активин Е". Средства, описанные в настоящем описании, которые антагонизируют "активин АВ", представляют собой средства, которые ингибируют одну или несколько активностей, которые опосредует субъединица β_A , и одну или несколько активностей, которые опосредует субъединица β_B . Тот же принцип также применим ко средству, которое связывает и/или ингибирует "активин АС", "активин ВС", "активин АЕ" и "активин ВЕ".

Белки NODAL имеют функции индукции и формирования мезодермы и энтодермы, а также последующей организации осевых структур, таких как сердце и желудок, в раннем эмбриогенезе. Продемонстрировано, что дорсальная ткань в развивающемся эмбрионе позвоночного преимущественно участвует в осевых структурах спинной струны и прехордальной пластинки, при этом она рекрутирует окружающие клетки для того, чтобы формировать неосевые эмбриональные структуры. Похоже, что NODAL передают сигналы через рецепторы I типа и II типа и внутриклеточные эффекторы, известные как белки SMAD. Исследования подтверждают идею о том, что ActRIIA и ActRIIB служат в качестве рецепторов II типа для NODAL [Sakuma et al. (2002) *Genes Cells*. 2002, 7:401-12]. Сделано предположение о том, что лиганды NODAL взаимодействуют с их кофакторами (например, Cripto или Cryptic) для того, чтобы активировать рецепторы активина I типа и II типа, которые фосфорилируют SMAD2. Белки NODAL участвуют во многих событиях, критичных для раннего эмбриона позвоночного, включая формирование мезодермы, формирование передних структур и определение оси слева-направо. Продемонстрировано экспериментальное доказательство того, что передача сигнала NODAL активирует pAR3-Lux, люциферазный репортер, который, как предварительно показано, отвечает специфически на активин и TGF- β . Однако, NODAL не способен индуцировать pTlx2-Lux, репортер, специфически отвечающий на морфогенетические белки кости. Недавние результаты предоставляют прямое биохимическое доказательство того, что передачу сигнала NODAL опосредуют SMAD2 и SMAD3, которые также опосредуют передачу сигнала TGF- β и активинов. Представлено дополнительное доказательство того, что внеклеточный белок Cripto или Cryptic необходим для передачи сигнала NODAL, что отличает его от передачи сигнала активина или TGF- β .

BMP и GDF вместе образуют семейство цитокинов с цистеиновым узлом, которые имеют общую характерную укладку суперсемейства TGF-P [Rider et al. (2010) *Biochem J.*, 429(1):1-12]. Это семейство включает, например, BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP2a, BMP3, BMP3b (также известный как GDF10), BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP8a, BMP8b, BMP9 (также известный как GDF2), BMP10, BMP11 (также известный как GDF11), BMP12 (также известный как GDF7), BMP13 (также известный как GDF6), BMP14 (также известный как GDF5), BMP15, GDF1, GDF3 (также известный как VGR2), GDF8 (также известный как миостатин), GDF9, GDF15 и декапентаплегик. Помимо способности индуцировать формирование кости, которая дала BMP их название, BMP/GDF демонстрируют морфогенетическую активность при развитии широкого спектра тканей. Гомо- и гетеродимеры BMP/GDF взаимодействуют с комбинацией димеров рецепторов I типа и II типа с образованием множества возможных комплексов передачи сигнала, что ведет к активации одной из двух конкурирующих групп факторов транскрипции SMAD. BMP/GDF обладают высоко специфическими и локализованными функциями. Их регуляция происходит многими путями, включая ограничение экспрессии BMP/GDF при развитии и через секрецию нескольких специфических белков антагонистов BMP, которые связываются с высокой аффинностью с цитокинами. Что интересно, многие из этих антагонистов похожи на лиганды суперсемейства TGF- β .

Фактор роста и дифференцировки 8 (GDF8) также известен как миостатин. GDF8 представляет собой негативный регулятор массы скелетных мышц и высоко экспрессирован в развивающихся и взрослых скелетных мышцах. Нулевая мутация GDF8 у трансгенных мышшей отличается выраженной гипертрофией и гиперплазией скелетных мышц [McPherron et al. *Nature* (1997) 387:83-90]. Схожее увеличение массы скелетных мышц свидетельствует о встречающихся в природе мутация GDF8 у крупного рогатого

скота и, что удивительно, у человека [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]. Исследования также показали, что мышечная атрофия, связанная с ВИЧ-инфекцией у человека, сопровождается увеличением экспрессии белка GDF8 [Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS* (1998) 95:14938-43]. Кроме того, GDF8 может модулировать продуцирование специфических ферментов мышц (например, креатинкиназы) и модулировать клеточную пролиферацию миобластов [публикация международной патентной заявки № WO 00/43781]. Пропептид GDF8 может нековалентно связываться со димером зрелого домена GDF8, инактивируя его биологическую активность [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, родственные фоллистатину белки [Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232].

GDF11, также известный как BMP11, представляет собой секретируемый белок, который экспрессируется в хвостовом зачатке, зачатке конечности, верхнечелюстной и нижнечелюстной дугах и дорсальных корешковых ганглиях во время развития мышцы [McPherron et al. (1999) *Nat. Genet.*, 22: 260-264; и Nakashima et al. (1999) *Mech. Dev.*, 80: 185-189]. GDF11 играет уникальную роль в формировании структур мезодермальной и нервной тканей [Gamer et al. (1999) *Dev Biol.*, 208:222-32]. Показано, что GDF11 представляет собой негативный регулятор хондрогенеза и миогенеза в развивающейся конечности цыпленка [Gamer et al. (2001) *Dev Biol.*, 229:407-20]. Экспрессия GDF11 в мышцах также наводит на мысль о его роли в регулировании роста мышцы сходно с GDF8. Кроме того, экспрессия GDF11 в головном мозге наводит на мысль о том, что GDF11 также может обладать активностями, которые относятся к функции нервной системы. Что интересно, обнаружено, что GDF11 ингибирует нейрогенез в обонятельном эпителии [Wu et al. (2003) *Neuron.*, 37:197-207]. Таким образом, ингибиторы GDF11 могут иметь применение *in vitro* и *in vivo* при лечении заболеваний, таких как заболевания мышц и нейродегенеративные заболевания (например, амиотрофический боковой склероз).

BMP7, также называемый остеогенным белком 1 (OP-1), хорошо известен как индуктор формирования хряща и кости. Кроме того, BMP7 регулирует широкий спектр физиологических процессов. Например, BMP7 может представлять собой остеоиндуктивный фактор, отвечающий за феномен эпителиального остеогенеза. Также обнаружено, что BMP7 играет роль в регулировании кальция и гомеостазе кости. Подобно активину, BMP7 связывается с рецепторами II типа, ActRIIA и ActRIIB. Однако, BMP7 и активин рекрутируют различные рецепторы I типа в гетеромерные рецепторные комплексы. Основным обнаруженным рецептором I типа для BMP7 является ALK2, тогда как активин связывается исключительно с ALK4 (ActRIIB). BMP7 и активин вызывают различные биологические реакции и активируют различные пути SMAD [Macias-Silva et al. (1998) *J Biol Chem.* 273:25628-36].

Как раскрыто в настоящем описании, сравнительные данные о связывании показывают, что гетеродимер ALK4:ActRIIB имеет измененный профиль связывания (лигандную избирательность) по сравнению с любыми соответствующими гомодимерами ActRIIB или ALK4. В частности, гетеродимер ALK4:ActRIIB демонстрирует усиленное связывание с активинем В по сравнению с любым гомодимером и сохраняет сильное связывание с активинем А, GDF8 и GDF11, как наблюдали при использовании гомодимера ActRIIB. Однако, гетеродимер ALK4:ActRIIB демонстрирует по существу сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3 по сравнению с гомодимером ActRIIB. В частности, BMP9 демонстрирует низкую или нулевую наблюдаемую аффинность к гетеродимеру ALK4:ActRIIB, тогда как этот лиганд прочно связывается с гомодимером ActRIIB.

Следовательно, эти результаты демонстрируют, что гетеродимеры ALK4:ActRIIB являются более избирательными антагонистами активина А, активина В, GDF8 и GDF11 по сравнению с гомодимерами ActRIIB. Соответственно, гетеродимер ALK4:ActRIIB будет более эффективен, чем гомодимер ActRIIB, в определенных применениях, где такой избирательный антагонизм благоприятен. Примеры включают терапевтические применения, где желательно сохранять антагонизм одного или нескольких из активина (например, активина А, активина В, активина АС, активина АВ), GDF8 и GDF11, но минимизировать антагонизм одного или нескольких из BMP9, BMP10 и BMP6.

Кроме того, гетеродимеры ALK4:ActRIIB, как раскрыто в настоящем описании, проявляют полезные анаболические эффекты, оказываемые на скелетные мышцы и кость, а также катаболические эффекты, оказываемые на жировую ткань, очень схожие с таковыми у гомодимера ActRIIB. Однако, в отличие от гомодимера ActRIIB, гетеродимер ActRIIB:ALK4 демонстрирует только низкую аффинность или временное связывание с BMP9 и BMP10 и поэтому будет проявлять небольшое или нулевое конкурентное ингибирование в процессах, опосредованных этими лигандами, таких как ангиогенез. Эта новая избирательность будет эффективна, например, при лечении пациентов, нуждающихся в стимулирующих эффектах, оказываемых, например, на мышцы и кость, и ингибирующих эффектах, оказываемых на жир, но не нуждающихся в измененном ангиогенезе.

Термины, используемые в этом описании, в целом имеют свои обычные значения в данной области, в рамках контекста этого раскрытия и в конкретном контексте, в котором используют каждый термин.

Определенные термины рассмотрены ниже или в другом месте в описании, чтобы предоставить дополнительное руководство для практика при описании композиций и способов по раскрытию, а так же их получения и использования. Объем или значение любого использования термина будут видны из конкретного контекста, в котором его используют.

Термины "гетеромер" или "гетеромультимер" представляют собой комплекс, который содержит по меньшей мере первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где вторая полипептидная цепь отличается аминокислотной последовательностью от первой полипептидной цепи по меньшей мере на один аминокислотный остаток. Гетеромер может содержать "гетеродимер", образованный первой и второй полипептидными цепями, или может формировать структуры более высокого порядка, в которых присутствует одна или несколько полипептидных цепей в дополнение к первой и второй полипептидным цепям. Образцовые структуры для гетеромультимера включают гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и дополнительные олигомерные структуры. Гетеродимеры обозначают в настоящем описании X:Y или эквивалентно как X-Y, где X представляет первую полипептидную цепь и Y представляет вторую полипептидную цепь. Гетеромеры и олигомерные структуры более высокого порядка 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 написания, относится к связи между двумя белками, которые обладают "общим эволюционным предком", включая белки из суперсемейств у одного и того же биологического вида организма, а также гомологичные белки у различных биологических видов организмов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) имеют гомологию последовательностей, как отражено в сходстве их последовательностей, или в отношении процента идентичности или через присутствие конкретных остатков или мотивов и консервативных положений. Однако, при обычном использовании и в данной заявке, термин "гомологичный", когда модифицирован наречием, таким как "высоко", может относиться к сходству последовательностей и может относиться или не относиться к общему эволюционному предку.

Термин "сходство последовательностей", во всех его грамматических формах, относится к степени идентичности или соответствия между нуклеиновыми кислотами или аминокислотными последовательностями, которые могут иметь или могут не иметь общего эволюционного предка.

"Процент (%) идентичности последовательностей" в отношении эталонной полипептидной (или нуклеотидной) последовательности определяют как процентную долю аминокислотных остатков (или нуклеиновой кислоты) в рассматриваемой последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам (или нуклеиновым кислотам) в эталонной полипептидной (нуклеотидной) последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, в случае необходимости, чтобы достичь максимального процента идентичности последовательностей, и не учитывая какие-либо консервативные замены в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно получить различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, используя общедоступное компьютерное программное обеспечение, такое как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая какие-либо алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей, которые сравнивают. Однако для целей настоящего описания значения % идентичности последовательностей аминокислот (нуклеиновой кислоты) получают с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа сравнения последовательностей ALIGN-2 создана в Genentech, Inc., и исходный код подан с пользовательской документацией в Бюро по охране авторских прав США, Washington D.C., 20559, где она зарегистрирована под № регистрации авторского права США TXU510087. Программа ALIGN-2 общедоступна в Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., или может быть скомпилирована из исходного кода. Программу ALIGN-2 следует компилировать для использования в операционной системе UNIX, включая Digital UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задает программа ALIGN-2, и они не меняются.

Как используют в настоящем описании, если не указано иное, "по существу не связывается с X" предназначен для того, чтобы обозначать, что средство имеет K_D , которая больше чем приблизительно 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} или выше (например, не поддающееся обнаружению связывание с помощью анализа, используемого для того, чтобы определять K_D) для "X", где "X" представляет собой конкретное средство, такое как белок или нуклеиновая кислота.

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

"Антагонизм", 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 активного белка в неактивное состояние) или снижения активности бел-

ка и/или гена.

Термины "около" и "приблизительно", как используют в связи с числовыми значениями на всем протяжении описания и формулы изобретения, обозначает интервал точности, известный и приемлемый для специалиста в данной области. В целом, такой интервал точности составляет $\pm 10\%$. Альтернативно и, в частности, в биологических системах, термины "около" и "приблизительно" могут обозначать значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно ≤ 5 -кратных и более предпочтительно ≤ 2 -кратных относительно заданного значения.

Числовые значения, описанные в настоящем описании, включают числа, которые определяют диапазоны.

Формы единственного числа включают формы множественного числа, пока контекст, в котором используют термин, явно не указывает на иное. Формы единственного числа, а также термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать взаимозаменяемо в настоящем описании. Кроме того, "и/или", когда используют в настоящем описании, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух или больше конкретных признаков или компонентов совместно друг с другом или друг вне друга. Таким образом, термин "и/или", как используют во фразе, такой как "А и/или В", в настоящем описании предназначен для того, чтобы включать "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогичным образом, термин "и/или", как используют во фразе, такой как "А, В и/или С", предназначен для того, чтобы охватывать 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 всем протяжении этого описания слово "содержать" или вариации, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение приведенного целого числа или групп целых чисел, но не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел.

2. Антагонисты ALK4:ActRIIB.

Как раскрыто в настоящем описании, обнаружено, что гетеродимеры ALK4:ActRIIB являются уникальными антагонистами лигандов суперсемейства TGF- β , которые демонстрируют различные профиль/избирательность связывания лигандов по сравнению с соответствующими гомодимерами ActRIIB и ALK4. В частности, образцовый гетеродимер ALK4:ActRIIB демонстрирует усиленное связывание с активином В по сравнению с любым гомодимером, сохраняет сильное связывание с активином А, GDF8 и GDF11, как наблюдали при использовании гомодимера ActRIIB, но демонстрирует по существу сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3. Фактически гетеродимер ALK4:ActRIIB демонстрирует от низкой до нулевой наблюдаемой аффинности к BMP9, тогда как этот лиганд прочно связывается с гомодимером ActRIIB. См. фиг. 6. Следовательно, эти результаты демонстрируют, что гетеродимеры ALK4:ActRIIB являются более избирательными антагонистами (ингибиторами) определенных лигандов суперсемейства TGF- β по сравнению с гомодимерами ActRIIB. Соответственно, гетеродимер ALK4:ActRIIB будет более эффективен, чем гомодимер ActRIIB, в определенных применениях, где такой избирательный антагонизм благоприятен. Примеры включают терапевтические применения, где желательно антагонизировать один или несколько из активина (например, активина А, активина В, активина АВ, активина АС), GDF8 и GDF11, при сниженном антагонизме одного или нескольких из BMP9, BMP10 и GDF3.

Кроме того, гетеродимер ALK4:ActRIIB вызывает определенные биологические эффекты, удивительно схожие с таковыми у гомодимера ActRIIB, несмотря на различную лигандную избирательность двух комплексов. Например, гетеродимер ALK4:ActRIIB проявляет полезные анаболические эффекты, оказываемые на скелетные мышцы и кость, а также катаболические эффекты, оказываемые на жировую ткань, очень схожие с таковыми у гомодимера ActRIIB-Fc. Однако в отличие от гомодимера ActRIIB, гетеродимер ActRIIB:ALK4 демонстрирует только низкую аффинность или временное связывание с BMP9 и BMP10 и поэтому должен иметь небольшое или нулевое конкурентное ингибирование в процессах, опосредуемых этим лигандами, таких как ангиогенез. Эту новую избирательность можно использовать, например, при лечении пациентов, нуждающихся в стимулирующих эффектах, оказываемых на мышцы и кость, и/или ингибирующих эффектах, оказываемых на жир, но не нуждающихся в измененном ангиогенезе. Следовательно, не желая ограничиваться конкретными механизмами действия, ожидают, что гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, а также их варианты, которые связывают/ингибируют по меньшей мере один или несколько из ALK4:ActRIIB-связывающих лигандов, будут эффективными средствами для содействия полезным анаболическим эффектам, оказываемым на скелетные мышцы и кость, и катаболическим эффектам, оказываемым на жировую ткань. Кроме того, ожидают, что другие антагонисты (ингибиторы) или комбинации антагонистов, которые имитируют связывающие/ингибирующие свойства гетеродимеров ALK4:ActRIIB, описанные в настоящем описании, а также средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют рецепторы ALK4 и/или ActRIIB, средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют ALK4- и/или ActRIIB-связывающие лиганды, средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют медиаторы передачи сигналов ниже по каскаду (например, SMAD), и/или средства, которые непосредственно или опосредованно антагонизируют корецепторы суперсемейства TGF- β , будут иметь схожие биологические эффекты, включая, например,

стимулирующие эффекты, оказываемые на мышцы и кость, и ингибирующие эффекты, оказываемые на жир. Эти антагонистические миметики совместно обозначают в настоящем описании как "антагонисты ALK4:ActRIIB" или "ингибиторы ALK4:ActRIIB".

А. Гетеромультимеры ALK4:ActRIIB.

В определенных аспектах, настоящее изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат один или несколько полипептидов рецептора ALK4 (например, SEQ ID №№ 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48) и один или несколько полипептидов рецептора ActRIIB (например, SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46), которые в целом обозначают в настоящем описании как "гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB" или "гетеромультимеры ALK4:ActRIIB". Предпочтительно, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию являются растворимыми, например, гетеромультимер может содержать растворимую часть (домен) рецептора ALK4 и растворимую часть (домен) рецептора ActRIIB. В целом, внеклеточные домены ALK4 и ActRIIB соответствуют растворимой части этих рецепторов. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию содержат внеклеточный домен рецептора ALK4 и внеклеточный домен рецептора ActRIIB. Примеры внеклеточных доменов рецепторов ALK4 и ActRIIB описаны в настоящем описании, и такие последовательности, а также их фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, можно использовать в соответствии с изобретениями по раскрытию (например, композиции гетеромультимеров ALK4:ActRIIB и их использование). Гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и олигомерные структуры более высокого порядка. См., например, фиг. 1, 2 и 8-10. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию представляют собой гетеродимеры ALK4:ActRIIB.

Предпочтительно гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию связываются с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β . В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут связываться с одним или несколькими из активина (например, активина А, активина В, активина С, активина Е, активина АС, активина АВ, активина ВС, активина АЕ и активина ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6, GDF3 и BMP10. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном А. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном В. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном С. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном Е. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном АВ. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном АС. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном АЕ. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном ВС. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с активинном ВЕ. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF11. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF8. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с BMP6. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с GDF3. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с BMP10. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB не связываются с или по существу не связываются с BMP9 (например, имеют неопределяемую K_a или K_d из-за временной природы взаимодействия между BMP9 и гетеромультимером ALK4:ActRIIB). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с более высокой аффинностью с активинном В по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с более низкой аффинностью с GDF3 по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с более низкой аффинностью с BMP9 по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB связываются с более низкой аффинностью с BMP10 по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. Необязательно, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB дополнительно могут связываться с одним или несколькими из BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP7, BMP8a, BMP8b, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF9b/BMP15, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NODAL, нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемина, персефина, MIS и Lefty.

В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB можно использовать для того, чтобы ингибировать (антагонизировать) передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD 2/3 и/или SMAD 1/5/8), опосредуемую одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β . В частности, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию можно использовать для того, чтобы ингибировать передачу внутриклеточных сигналов посредством одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β , например, в анализе на основе клеток, таком как те, которые описаны в настоящем описании. Например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала, опосредуемую одним или

несколькими из активина (например, активина А, активина В, активина С, активина Е, активина АС, активина АВ, активина ВС, активина АЕ и активина ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6, GDF3 и BMP10, в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина А в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина В в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина С в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина D в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина Е в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина АВ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина АС в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина ВС в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина АЕ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала активина ВЕ в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала GDF11 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала GDF8 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала BMP6 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала GDF3 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут ингибировать передачу сигнала BMP9 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB не ингибируют или по существу не ингибируют передачу сигнала BMP9 в анализе на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более сильными ингибиторами передачи сигнала активина В в анализе на основе клеток по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более слабыми ингибиторами передачи сигнала BMP10 в анализе на основе клеток по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более сильными ингибиторами передачи сигнала GDF3 в анализе на основе клеток по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB являются более сильными ингибиторами передачи сигнала BMP9 в анализе на основе клеток по сравнению с соответствующим гомомультимером ActRIIB. Неожидательно, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB дополнительно могут ингибировать передачу внутриклеточных сигналов одним или несколькими из BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP7, BMP8a, BMP8b, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF9b/BMP15, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NODAL, нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемина, персефина, MIS и Lefty в анализе на основе клеток.

Как используют в настоящем описании, термин "ActRIIB" относится к семейству белков рецепторов активина типа IIB (ActRIIB) от каких-либо биологических видов и вариантов, полученных из таких белков ActRIIB посредством мутагенеза или другой модификации. Упоминание об ActRIIB в настоящем описании понимают как упоминание о каком-либо одной форм, идентифицированных из в настоящее время. Члены семейства ActRIIB в целом представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена, содержащего богатый цистеином участок, трансмембранный домен и цитоплазматический домен с предсказанной активностью серин/треонинкиназы.

Термин "полипептид ActRIIB" включает полипептиды, содержащие какой-либо встречающийся в природе полипептид члена семейства ActRIIB, а также какие-либо его варианты (включая мутантные, фрагментные, слитые формы и пептидомиметики), которые сохраняют полезную активность. Примеры таких вариантов полипептидов ActRIIB предоставлены на всем протяжении настоящего раскрытия, а также в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2006/012627, WO 2008/097541 и WO 2010/151426, которые включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Нумерация аминокислот для всех родственных ActRIIB полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ActRIIB человека, предоставленной далее (SEQ ID № 1), пока конкретно не указано иное.

Последовательность белка-предшественника ActRIIB человека представляет собой следующее:

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLGERCE
 51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
 101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
 151 LIVLLAFWY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELVCHV AETMSRGLSY
 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG
 401 KAADGPVDEY MLPFEEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHGGL
 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID № 1)

Сигнальный пептид обозначен одинарным подчеркиванием; внеклеточный домен обозначен полужирным начертанием; и потенциальные эндогенные N-связанные участки гликозилирования обозначены двойным подчеркиванием.

Процессированная (зрелая) последовательность внеклеточного полипептида ActRIIB представляет собой следующее:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID
 № 2)

В некоторых вариантах осуществления белок можно получать с последовательностью "SGR..." на N-конце. С-концевой "хвост" внеклеточного домена обозначен одинарным подчеркиванием. Последовательность с делецией "хвоста" (последовательность $\Delta 15$) представляет собой следующее:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID № 3)

В литературе также сообщалось о форме ActRIIB с аланином в положении 64 из SEQ ID № 1 (A64) См., например, Hilden et al. (1994) Blood, 83(8): 2163-2170. Заявители установили, что слитый белок ActRIIB-Fc, который содержит внеклеточный домен ActRIIB с заменой A64 имеет относительно низкую аффинность к активину и GDF11. В отличие от этого, тот же слитый белок ActRIIB-Fc с аргинином в положении 64 (R64) имеет аффинность к активину и GDF11 в диапазоне от низкого наномолярного до высокого пикомолярного. Следовательно, последовательности с R64 используют в качестве эталонной последовательности "дикого типа" для ActRIIB человека в этом раскрытии.

Форма ActRIIB с аланином в положении 64 представляет собой следующее:

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLGERCE
 51 GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
 101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
 151 LIVLLAFWY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELVCHV AETMSRGLSY
 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG
 401 KAADGPVDEY MLPFEEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHGGL
 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID № 4)

Сигнальный пептид обозначен одинарным подчеркиванием и внеклеточный домен обозначен полужирным начертанием.

Процессированная (зрелая) последовательность внеклеточного полипептида ActRIIB альтернативной формы A64 представляет собой следующее:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID
 № 5)

В некоторых вариантах осуществления белок можно получать с последовательностью "SGR..." на

N-конце. С-концевой "хвост" внеклеточного домена обозначен одинарным подчеркиванием. Последовательность с делецией "хвоста" (последовательность A15) представляет собой следующее:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHACYASWANSSGTIELVKKGCW

LDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID № 6)

Далее приведена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник ActRIIB человека, (SEQ ID № 7), в которой представлены нуклеотиды 25-1560 из эталонной последовательности Genbank NM 001106.3, которая кодирует аминокислоты 1-513 предшественника ActRIIB. Последовательность, как показано, предусматривает аргинин в положении 64, и ее можно модифицировать для того, чтобы предоставить вместо него аланин. Сигнальная последовательность подчеркнута.

1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
 51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
 101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
 151 GCGGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCGG ACAGCCCCCA
 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCATCGG GGGCCTTTCC
 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA
 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
 551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
 601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
 851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTCTCATA
 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 TTCTGCGCA
 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGACACA
 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTGAAACA CCCGGGCCTG
 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
 1401 TCGCTTGTC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCCGAGGT
 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID № 7)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей процессированный внеклеточный полипептид ActRIIB человека, представляет собой следующее (SEQ ID № 8). Последовательность, как показано, предусматривает аргинин в положении 64, и ее можно модифицировать для того, чтобы предоставить аланин вместо него.

```

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
(SEQ ID № 8)

```

Выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточного домена ActRIIB человека и внеклеточного домена ActRIIA человека проиллюстрировано на фиг. 3. Это выравнивание показывает аминокислотные остатки в обоих рецепторах, которые, как полагают, непосредственно контактируют с лигандами ActRII. Например, составные структуры ActRII обозначают, что карман связывания ActRIIB-лиганд, отчасти, определяют остатки Y31, N33, N35, с L38 до T41, E47, E50, с Q53 до K55, L57, H58, Y60, S62, K74, с W78 до N83, Y85, R87, A92 и с E94 до F101. Ожидают, что в этих положениях допустимы консервативные мутации.

Кроме того, ActRIIB достаточно консервативен среди позвоночных, причем большие фрагменты внеклеточного домена полностью консервативны. Например, на фиг. 4 изображено множественное выравнивание последовательностей внеклеточного домена ActRIIB человека по сравнению с различными ортологами ActRIIB. Многие лиганды, которые связываются с ActRIIB, также высоко консервативны. Соответственно, по этим выравниваниям, возможно предсказать ключевые аминокислотные положения в лигандсвязывающем домене, которые важны для нормальных ActRIIB-лигандсвязывающих активностей, а также для того, чтобы предсказать аминокислотные положения, которые вероятно допускают замены без значительного изменения нормальных ActRIIB-лигандсвязывающих активностей. Следовательно, активный вариант полипептида ActRIIB человека, который можно использовать в соответствии с раскрытыми в настоящее время способами, может содержать одну или несколько аминокислот в соответствующих положениях из последовательности ActRIIB другого позвоночного, или может содержать остаток, который схож с таковым в последовательностях человека или других позвоночных. Без ограничения, следующие примеры иллюстрируют этого подход к определению активного варианта ActRIIB. L46 во внеклеточном домене человека (SEQ ID № 53) является валином в ActRIIB *Xenopus* (SEQ ID № 55), и, таким образом, это положение можно изменять, и необязательно можно изменять 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, что этот сайт может допускать широкий спектр изменений, включая полярные остатки, такие как E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y и, вероятно, A. T93 во внеклеточном домене человека представляет собой K у *Xenopus*, что указывает, что широкие структурные вариации допустимы в этом положении, причем предпочтительные 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, следовательно, должна быть допустима Y или другая гидрофобная группа, такая как I, V или L. E111 во внеклеточном домене человека представляет собой K у *Xenopus*, что указывает, что заряженные остатки будут допустимы в этом положении, включая D, R, K и H, а также Q и N. R112 во внеклеточном домене человека представляет собой K у *Xenopus*, что указывает, что основные остатки допустимы в этом положении, включая R и H. A в положении 119 во внеклеточном домене человека является относительно слабо консервативным и встречается в виде P у грызунов и V у *Xenopus*, таким образом, по существу любая аминокислота должна быть допустима в этом положении.

Кроме того, белки ActRII охарактеризованы в данной области в отношении структурных и функциональных характеристик, в частности в отношении связывания лигандов [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 положениям настоящего описания, эти источники предоставляют достаточное руководство о том, как создавать варианты ActRIIB, которые сохраняют одну или несколько нормальных активностей (например, лигандсвязывающую активность).

Например, определяющий структурный мотив, известный как укладка токсина с тремя пальцами, важен для связывания лиганда рецепторами I типа и II типа, и его формируют посредством консервативные остатки цистеина, расположенные 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]. Соответственно, лигандсвязывающие домены сердцевин ActRIIB человека, как размечено самыми внешними из этих консервативных цистеинов, соответствуют положениям 29-109 из SEQ ID № 1 (предшественник ActRIIB). Таким образом, структурно менее упорядоченные аминокислоты, фланкирующие эти демаскированные цистеином последовательности сердцевин, могут быть усечены при-

близительно 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 неизбежного изменения связывания лигандов. Образцовые внеклеточные домены ActRIIB для N-концевого и/или C-концевого усечения включают SEQ ID №№ 2, 3, 5 и 6.

Attisano et al. показали, что делеция пролиноврнр узла на C-конце внеклеточного домена ActRIIB снижала аффинность рецептора к активину. Слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий аминокислоты 20-119 представленной SEQ ID № 1, "ActRIIB(20-119)-Fc", обладает сниженным связыванием с GDF11 и активинном относительно ActRIIB(20-134)-Fc, который содержит участок пролинового узла и полный околосмембранный домен (см., например, патент США № 7842663). Однако, белок ActRIIB(20-129)-Fc сохраняет схожую, но несколько сниженную активность относительно дикого типа, даже несмотря на то, что разрушен участок пролинового узла.

Таким образом, ожидают, что все внеклеточные домены ActRIIB, которые заканчиваются на аминокислотах 134, 133, 132, 131, 130 и 129 (относительно SEQ ID № 1), активны, но конструкции, заканчивающиеся на 134 или 133, могут быть наиболее активными. Аналогичным образом, не ожидают, что мутации в каких-либо остатках 129-134 (относительно SEQ ID № 1) изменяют аффинность связывания лигандов с помощью больших краев. В подтверждение этого в данной области известно, что мутации P129 и P130 (относительно SEQ ID № 1) по существу не снижают связывание лигандов. Следовательно, полипептид ActRIIB по настоящему раскрытию может заканчиваться уже на аминокислоте 109 (последний цистеин), однако ожидают, что формы, заканчивающиеся на или между 109 и 119 (например, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 или 119), имеют сниженное связывание лигандов. Аминокислота 119 (относительно представленной SEQ ID № 1) низко консервативна и поэтому легко изменяется или усекается. Полипептиды ActRIIB, заканчивающиеся на 128 (относительно SEQ ID № 1) или далее, должны сохранять лигандсвязывающую активность. Полипептиды ActRIIB, заканчивающиеся на или между 119 и 127 (например, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 или 127) относительно SEQ ID № 1, будут обладать промежуточной связывающей способностью. Может быть желательным использование любых имз этих форм, в зависимости от клинических или экспериментальных обстоятельств.

Ожидают, что белок, начинающийся на аминокислоте 29 или ранее (относительно SEQ ID № 1), будет сохранять лигандсвязывающую активность на N-конце ActRIIB. Аминокислота 29 представляет начальный цистеин. Мутация аланина в аспарагин в положении 24 (относительно SEQ ID № 1) вводит последовательность N-связанного гликозилирования, по существу не влияя на связывание лигандов [патент США № 7842663]. Это подтверждает, что мутации в участке между сигнальным отщепляемым пептидом и шитом цистеинами участком, соответствующим аминокислотам 20-29, вполне допустимы. В частности, полипептиды ActRIIB, начинающиеся в положениях 20, 21, 22, 23 и 24 (относительно SEQ ID № 1), должны сохранять основную лигандсвязывающую активность, и полипептиды ActRIIB, начинающиеся в положениях 25, 26, 27, 28 и 29 (относительно SEQ ID № 1) также предположительно сохраняют лигандсвязывающую активность. Например, в патенте США № 7842663 продемонстрировано, что, к удивлению, конструкция ActRIIB, начинающаяся в 22, 23, 24 или 25, будет иметь наибольшую активность.

В совокупности, общая формула активной части (например, лигандсвязывающей части) ActRIIB содержит аминокислоты 29-109 из SEQ ID № 1. Следовательно, полипептиды ActRIIB, например, могут содержать, состоять по существу из или состоять 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 какой-либо одной из аминокислот 20-29 (например, начинающейся в каком-либо одной из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) из SEQ ID № 1, и заканчивающейся в положении, соответствующем какой-либо одной из аминокислот 109-134 (например, заканчивающейся в какой-либо одной 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) из SEQ ID № 1. Другие примеры включают полипептиды, которые начинаются в положении 20-29 (например, каком-либо одном из положений 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) или 21-29 (например, каком-либо одном из положений 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) из SEQ ID № 1 и заканчиваются в положении 119-134 (например, каком-либо одном из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134), 119-133 (например, каком-либо одном из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 или 133), 129-134 (например, каком-либо одном из положений 129, 130, 131, 132, 133 или 134) или 129-133 (например, каком-либо одном из положений 129, 130, 131, 132 или 133) из SEQ ID № 1. Другие примеры включают конструкции, которые начинаются в положении 20-24 (например, каком-либо одном из положений 20, 21, 22, 23 или 24), 21-24 (например, каком-либо одном из положений 21, 22, 23 или 24) или 22-25 (например, каком-либо одном из положений 22, 23 или 25) из SEQ ID № 1 и заканчиваются в положении 109-134 (например, каком-либо одном 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, каком-либо одном из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134) или 129-134 (например, каком-либо одном из положений 129, 130, 131, 132, 133 или 134) из SEQ ID № 1. Также преду-

смотрены варианты в пределах этих диапазонов, в частности, те, которые обладают 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 из SEQ ID № 1.

Вариации, описанные в настоящем описании, можно комбинировать различными способами. В некоторых вариантах осуществления варианты ActRIIB содержат не больше чем 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 консервативных аминокислотных замен в лигандсвязывающем кармане, и ноль, одно или больше неконсервативных изменений в положениях 40, 53, 55, 74, 79 и/или 82 в лигандсвязывающем кармане. Участки вне кармана связывания, в которых вариабельность может быть особенно допустима, включают аминок- и карбокси-концы внеклеточного домена (как указано выше), и положения 42-46 и 65-73 (относительно SEQ ID № 1). Замена аспарагина на аланин в положении 65 (N65A) фактически усовершенствует связывание лигандов на фоне A64 и, таким образом, предположительно не оказывает отрицательного эффекта на связывание лигандов на фоне R64 [патент США № 7842663]. Эта замена, вероятно, элиминирует гликозилирование в N65 на фоне A64, таким образом демонстрируя, что значительное изменение в этом участке вероятно будет допустимо. Хотя замена R64A слабо допустима, R64K вполне допустима, и, таким образом, другой основной остаток, такой как H, может быть допустим в положении 64 [патент США № 7842663]. Дополнительно, результаты программы мутагенеза, описанные в данной области, показывают, что в ActRIIB имеют место аминокислотные положения, которые часто полезно делать консервативными. Относительно SEQ ID № 1, это включает положение 80 (кислая или гидрофобная аминокислота), положение 78 (гидрофобная и, в частности, триптофан), положение 37 (кислая и, в частности, аспарагиновая или глутаминовая кислота), положение 56 (основная аминокислота), положение 60 (гидрофобная аминокислота, в частности, фенилаланин или тирозин). Таким образом, раскрытие предусматривает аминокислотный каркас, которые может быть консервативным в полипептидах ActRIIB. Другие положения, которые может быть желательно делать консервативными, представляют собой следующее: положение 52 (кислая аминокислота), положение 55 (основная аминокислота), положение 81 (кислая), 98 (полярная или заряженная, в частности, E, D, R или K), все относительно SEQ ID № 1.

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

Предпочтительно, полипептиды ActRIIB для использования в соответствии с изобретениями по раскрытию являются растворимыми (например, внеклеточный домен ActRIIB). В других предпочтительных вариантах осуществления, полипептиды ActRIIB для использования в соответствии с раскрытием связываются с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β . Следовательно, в некоторых вариантах осуществления полипептиды ActRIIB для использования в соответствии с раскрытием ингибируют (антагонизируют) активность (например, ингибирование передачи сигнала SMAD) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β . В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит существу из 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 в остатке, соответствующую аминокислотам 20-29 (например, начинающейся в какой-либо одной из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) из SEQ ID № 1, и заканчивающейся в положении, соответствующем аминокислотам 109-134 (например, заканчивающейся в какой-либо одной 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) из SEQ ID № 1. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит или состоит по существу 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 из SEQ ID № 1. В других предпочтительных вариантах осуществления, гетеромультимерные комплексы по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит из или состоит по существу 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 из SEQ ID № 1. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию 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 какой-либо одной из SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 или 46. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию содержат не содержат полипептид ActRIIB, в котором положение, соответствующее L79 из SEQ ID № 1, представляет собой кислую аминокислоту (т.е., не является встречающимся в природе аминокислотным остатком D или E или искусственной кислотной аминокислотой).

В определенных аспектах, настоящее изобретение относится к белковым комплексам, которые содержат полипептид ALK4. Как используют в настоящем описании, термин "ALK4" относится к семейст-

ву подобных рецептору активина белков киназы-4 от какого-либо биологического вида и вариантам, полученным из таких белков ALK4 посредством мутагенеза или другой модификации. Упоминание о ALK4 в настоящем описании понимают как упоминание о какой-либо одной из форм, идентифицированных в настоящее время. Члены семейства ALK4 в целом представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена с богатым цистеином участком, трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом с предсказанной активностью серин/треонинкиназы.

Термин "полипептид ALK4" включает полипептиды, содержащие какой-либо встречающийся в природе полипептид члена семейства ALK4, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и пептидомиметики), которые сохраняют полезную активность. Нумерация аминокислот для всех родственных ALK4 полипептидов, описанных в настоящем описании, основана на нумерации последовательности белка-предшественника ALK4 человека, приведенной далее (SEQ ID № 9), пока конкретно не указано иное.

Каноническая последовательность белка-предшественника ALK4 человека (эталонная последовательность NCBI NP_004293) представляет собой следующее:

```

1  MAESAGASSF FPLVLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD
61  GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS
GHLKEPEHPS
121 MWGPVELVGI IAGPVFLFL I IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ
181 DLVYDLSTSG SGGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD
VAVKIFSSRE
241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL
FDYLNRYTVT
301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA
IADLGLAVRH
361 DAVTDTIDIA PNQRVGTKRY MAPEVLDETI NMKHFDSFKC ADIYALGLVY
WEIARRCNSG
421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG
KMMRECWYAN
481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (SEQ ID № 9)

```

Сигнальный пептид обозначен одинарным подчеркиванием и внеклеточный домен обозначен полужирным начертанием.

Процессированная (зрелая) последовательность внеклеточного полипептида ALK4 человека представляет собой следующее:

```

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPF
YCLSEDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID № 10)

```

Далее приведена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник ALK4, (SEQ ID № 11), которая соответствует нуклеотидам 78-1592 эталонной последовательности Genbank NM_004302.4. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен обозначен полужирным начертанием.

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCCGG
CAGCGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCC'TCCAG
GCCAAC'TACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGG
AGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTG
CCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
TTGAGGGTGGCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCGGTGGAGC
TGGTAGGCATCATCGCCGGCCCCGGTGTTCCTCCTGTTCCCTCATCATCATCATTGTTTTCTTGT
CATTAAC'TATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGT
GAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGT
CTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGAT
TATTGGCAAGGGTCCGTTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGTATGTGGCTGTG
AAAATATTCTTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATAACCAGACGGTCA
TGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGATAATGGCACCTGGAC
ACAGCTGTGGCTTGTCTTCTGACTATCATGAGCACGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTAC
ACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGCTGGCACACCTGC
ACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAA
CATTCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCATGAT
GCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCC
CTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTA
TGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATCTGGAGGAGTCCATGAAGAA
TATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTG
TATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAAGTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACCTGCGGGT
GATGGGGAAGATGATGCGAGAGTGTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCCGCTGACGGCCCTGCGC
ATCAAGAAGACCCTCTCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID № 11)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внеклеточный полипептид ALK4, представляет собой следующее:

TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCCAA
 CTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCAC
 CATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGA
 GCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAG
 GGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCGGTGGAG (SEQ
 ID № 12)

Альтернативная изоформа последовательности белка-предшественника ALK4 человека, изоформа С (эталонная последовательность NCBI NP 064733.3), представляет собой следующее:

1 MAESAGASSE FPLVVLLLAG SGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD
61 GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSIDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS
GHLKEPEHPS
121 MWGPVELVGI IAGPVFLLFL IIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ
181 DLVYDLSTSG SGSGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD
VAVKIFSSRE
241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK ADCSFLTLPW EVVMVSAAPK
LRSLRLQYKG
301 GRGRARFLFP LNGTWTQLW LVSDYHEHGS LFDYLNRYTV TIEGMIKLAL
SAASGLAHLH
361 MEIVGTQGKP GIAHRDLKSK NILVKKNGMC AIADLGLAVR HDAVTDITDI
APNQRVGTKR
421 YMAPEVLDET INMKHFDSFK CADIYALGLV YWEIARRCNS GGVHEEYQLP
YYDLVPSDPS
481 IEEMRKVVCD QKLRPNIPNW WQSYEALRVM GKMMRECWYA NGAARLTALR
IKKTLSQLSV
541 QEDVKI (SEQ ID № 19)

Сигнальный пептид обозначен одинарным подчеркиванием и внеклеточный домен обозначен полужирным начертанием.

Процессированная (зрелая) последовательность внеклеточного полипептида ALK4 (изоформа С) представляет собой следующее:

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCI**PKVELVPAGKPF**
YCLSSIDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID № 20)

Далее приведена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник ALK4 (изоформа С) (SEQ ID № 21), которая соответствует нуклеотидам 78-1715 эталонной последовательности Genbank NM_020328.3. Сигнальная последовательность подчеркнута и внеклеточный домен обозначен полужирным начертанием.

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCCGG
CAGCGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCCTCCAG
GCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGG
AGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTG
CCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
TTGAGGGTGGCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCGGTGGAGC
 TGGTAGGCATCATCGCCGGCCCCGGTGTTCCTCCTGTTCCCTCATCATCATCATTGTTTTCTTGT
 CATTAACATATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGT
 GAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGT
 CTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGAT
 TATTGGCAAGGGTTCGGTTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGTATGTGGCTGTG
 AAAATATTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTTCAGGGAAGCAGAGATATAACCAGACGGTCA
 TGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGCAGACTGCTCATTCCT
 CACATTGCCATGGGAAGTTGTAATGGTCTCTGCTGCCCCAAGCTGAGGAGCCTTAGACTCCAA
 TACAAGGGAGGAAGGGGAAGAGCAAGATTTTTATTCCCACTGAATAATGGCACCTGGACACAGC
 TGTGGCTTGTCTTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGT
 GACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATG
 GAGATCGTGGGCACCCAAGGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTC
 TGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTTCATGATGCAGT
 CACTGACACCATTGACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCCTGAA
 GTACTTGTATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTATGCCC
 TCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCA
 GCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGT
 GATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCCTGCGGGTGTATGG
 GGAAGATGATGCGAGAGTGTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCCCCTGACGGCCCTGCGCATCAA
 GAAGACCSTCTCCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID № 21)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внеклеточный полипептид ALK4, (изоформа С) представляет собой следующее:

TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCCTCCAGGCCAA
 CTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCAC
 CATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGA
 GCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGGAG
 GGTGCCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCGGTGGAG (SEQ
 ID № 22)

В определенных вариантах осуществления раскрытие относится к гетеромультимерам, которые содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы. Предпочтительно, полипептиды ALK4 для использования в соответствии с изобретениями по раскрытию (например, гетеромультимеры, которые содержат полипептид ALK4, и их использование) являются растворимыми (например, внеклеточный домен ALK4). В других предпочтительных вариантах осуществления, полипептиды ALK4 для использования в соответствии с изобретениями по раскрытию связываются с и/или ингибируют (антагонизируют) активность (например, передачу сигнала SMAD) одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β . В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичен аминокислотной последовательности из SEQ ID № 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 или 48. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимерные комплексы по раскрытию состоят или по существу состоят из по меньшей мере одного полипептида ALK4, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98% или 99% иденти-

чен аминокислотной последовательности из SEQ ID № 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 или 48.

ALK4 достаточно консервативен среди позвоночных, причем большие фрагменты внеклеточного домена полностью консервативны. Например, на фиг. 7 изображено множественное выравнивание последовательностей внеклеточного домена человека ALK4 по сравнению с различными ортологами ALK4. Многие лиганды, которые связываются с ALK4, также высоко консервативны. Соответственно, по этим выравниваниям возможно предсказать ключевые аминокислотные положения в лигандсвязывающем домене, которые важны для нормальных ALK4-лигандсвязывающих активностей, а также предсказать аминокислотные положения, которые вероятно допускают замену без значительного изменения нормальных ALK4-лигандсвязывающих активностей. Следовательно, активный вариант полипептида ALK4 человека, который можно использовать в соответствии со способами, раскрытыми в настоящее время, может содержать одну или несколько аминокислот в соответствующих положениях из последовательности ALK4 другого позвоночного или может содержать остаток, который схож с таковым в последовательностях человека или других позвоночных. Без ограничения, следующие примеры иллюстрируют этого подход к определению активного варианта ALK4. V6 во внеклеточном домене человека ALK4 (SEQ ID № 59) представляет собой изолейцин в ALK4 *Mus musculus* (SEQ ID № 63) и, таким образом, положение можно изменять и необязательно можно изменять на другой гидрофобный остаток, такой как L, I или F, или неполярный остаток, такой как A, как наблюдают в ALK4 *Gallus gallus* (SEQ ID № 62). E40 во внеклеточном домене человека представляет собой K в ALK4 *Gallus gallus*, что указывает, что этот сайт может допускать широкий спектр изменений, включая полярные остатки, такие как E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y и, вероятно, неполярный остаток, такой как A. S15 во внеклеточном домене человека представляет собой D в ALK4 *Gallus gallus*, что указывает, что в этом положении допустимы широкие структурные вариации, причем предпочтительны полярные остатки, такие как S, T, R, E, K, H, G, P, G и Y. E40 во внеклеточном домене человека представляет собой K в ALK4 *Gallus gallus*, что указывает, что в этом положении допустимы заряженные остатки, включая D, R, K, H, а также Q и N. R80 во внеклеточном домене человека представляет собой K в ALK4 *Condylura cristata* (SEQ ID № 60), что указывает, что в этом положении допустимы основные остатки, включая R, K и H. Y77 во внеклеточном домене человека представляет собой F в ALK4 *Sus scrofa* (SEQ ID № 64), что указывает, в этом положении допустимы ароматические остатки, включая F, W и Y. P93 во внеклеточном домене человека является относительно слабо консервативным и встречается в виде S в ALK4 *Erinaceus europaeus* (SEQ ID № 61) и N в *Gallus gallus* ALK4, таким образом, по существу любая аминокислота должна быть допустима в этом положении.

Кроме того, белки ALK4 охарактеризованы в данной области в отношении структурных и функциональных характеристик, в частности, в отношении связывания лигандов [например, Harrison et al. (2003) *J Biol Chem* 278 (23): 21129-21135; Romano et al. (2012) *J Mol Model* 18(8):3617-3625; и Calvanese et al. (2009) 15(3):175-183]. В дополнение к положениям в настоящем описании, эти источники предоставляют достаточное руководство о том, как создавать варианты ALK4, которые сохраняют одну или несколько нормальных активностей (например, лигандсвязывающую активность).

Например, определяющий структурный мотив, известный как укладка токсина с тремя пальцами, важен для связывания лигандов рецепторами I типа и II типа, и его формируют консервативные остатки цистеина, расположенные 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]. Соответственно, лигандсвязывающие домены сердцевин ALK4 человека, как размечено самым внешним из этих консервативных цистеинов, соответствуют положениям 34-101 из SEQ ID № 9 (предшественник ALK4). Таким образом, структурно менее упорядоченные аминокислоты, фланкирующие эти демаскированные цистеином последовательности сердцевин, могут быть усечены на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 остатков на N-конце или 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 или 26 остатков на C-конце без неизбежного изменения связывания лигандов. Образцовые внеклеточные домены ALK4 для N-концевого и/или C-концевого усечения включают SEQ ID №№ 10 и 20.

Соответственно, общая формула для активной части (например, лигандсвязывающей части) ALK4 содержит аминокислоты 34-101. Следовательно полипептиды ALK4, например, могут содержать, состоять по существу из или состоять 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 ALK4, начинающейся в остатке, соответствующем какой-либо одной из аминокислот 24-34 (например, начинающейся в какой-либо одной из аминокислот 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34) из SEQ ID № 1, и заканчивающейся в положении, соответствующем какой-либо одной из аминокислот 101-126 (например, заканчивающейся в какой-либо одной из аминокислот 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 или 126) из SEQ ID № 9. Другие примеры включают конструкции, которые начинаются в положении 24-34 (например, каком-либо одном из положений 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), 25-34 (например, каком-либо одном из положений 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34) или 26-34 (например, каком-либо одном из положений 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34) из SEQ ID № 9 и заканчиваются в положении 101-126 (например, каком-либо одном из положений 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 или 126), 102-126 (например, каком-либо одном из положений 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 12 5 или 126), 101-125 (например, каком-либо одном из положений 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 или 125), 101-124 (например, каком-либо одном из положений 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123 или 124), 101-121 (например, каком-либо одном из положений 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 или 121), 111-126 (например, каком-либо одном из положений 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 или 126), 111-125 (например, каком-либо одном из положений 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 или 125), 111-124 (например, каком-либо одном из положений 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123 или 124), 121-126 (например, каком-либо одном из положений 121, 122, 123, 124, 125 или 126), 121-125 (например, каком-либо одном из положений 121, 122, 123, 124 или 125), 121-124 (например, каком-либо одном из положений 121, 122, 123 или 124) или 124-126 (например, каком-либо одном из положений 124, 125 или 126) из SEQ ID № 9. Также предусмотрены варианты в этих диапазонах, в частности, те, которые обладают 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 из SEQ ID № 9.

Вариации, описанные в настоящем описании, можно комбинировать различными способами. В некоторых вариантах осуществления варианты ALK4 содержат не больше чем 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 консервативных аминокислотных изменений в лигандсвязывающем кармане. Сайты вне кармана связывания, в которых вариабельность может быть особенно допустима, включают аминок- и карбокси-концы внеклеточного домена (как указано выше),

В определенных аспектах, настоящее изобретение относится к гетеромультимерам, которые содержат один или несколько полипептидов рецептора ALK4 (например, SEQ ID №№ 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48) и один или несколько полипептидов рецептора ActRIIB (например, SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46), которые в целом обозначают в настоящем описании как "гетеромультимерные комплексы ALK4:ActRIIB" или "гетеромультимеры ALK4:ActRIIB". Предпочтительно, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию являются растворимыми, например, гетеромультимеры содержат растворимую часть (домен) рецептора ALK4 и растворимую часть (домен) рецептора ActRIIB. В целом, внеклеточные домены ALK4 и ActRIIB соответствуют растворимой части этих рецепторов. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры по раскрытию содержат внеклеточный домен ALK4, рецептор и внеклеточный домен рецептора ActRIIB. Образцовые внеклеточные домены рецепторов ALK4 и ActRIIB описаны в настоящем описании, и такие последовательности, а также их фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы можно использовать в соответствии с изобретениями по раскрытию (например, композиции гетеромультимеров ALK4:ActRIIB и их использование). В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит по существу из или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности из SEQ ID № 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47 и 48. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, который содержит, состоит по существу из, состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична части ALK4, начинающейся в остатке, соответствующем какой-либо одной из аминокислот 24-34, 25-34 или 26-34, и заканчивающейся в положении 101-126, 102-126, 101-125, 101-124, 101-121, 111-126, 111-125, 111-124, 121-126, 121-125, 121-124 или 124-126 из SEQ ID № 9. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит по существу из, состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности какой-либо одной из SEQ ID №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45 и 46. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который содержит, состоит по существу из, состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична части ActRIIB, начинающейся в остатке, соответствующем какой-либо одной из аминокислот 20-29, 20-24, 21-24, 22-25 или 21-29, и заканчивающейся в положении 109-134, 119-134, 119-133, 129-134 или 129-133 из SEQ ID № 1. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, в котором положение, соответствующее L79 из SEQ ID № 1, не является кислой аминокислотой (т.е., не встречающийся в природе аминокислотный остаток D или E или искусственная кислая аминокислота). Гетеромультимеры ALK4:ActRIIB по раскрытию включают, например, гетеродимеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры и олигомерные структуры более высокого порядка. См., например, фиг. 1, 2 и 8-10. В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимерные комплек-

сы по раскрытию представляют собой гетеродимеры ALK4:ActRIIB.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает создание функциональных вариантов посредством модификации структуры полипептида ALK4 и/или полипептида ActRIIB. Варианты можно получать посредством замены, делеции, добавления аминокислоты или их сочетаний. Например, обоснованно ожидать, что изолированное замещение лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или схожее замещение аминокислоты на структурно родственную аминокислоту (например, консервативные мутации) не будет оказывать значительного эффекта на биологическую активность получаемой молекулы. Консервативные замены представляют собой те, которые имеют место в семействе аминокислот, которые схожи своими боковыми цепями. Ведет ли изменение аминокислотной последовательности полипептида по раскрытию к функциональному гомологу, можно легко определить посредством оценки способности варианта полипептида вызывать ответ в клетках таким образом, который схож с полипептидом дикого типа, или связываться с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β , включая, 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 ВС, активин АЕ, активин ВЕ, NODAL, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty.

В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия предусматривает получение функциональных вариантов посредством модификации структуры полипептида ALK4 и/или ActRIIB для таких целей, как увеличение терапевтического эффекта или стабильности (например, увеличение срока хранения и/или устойчивости к протеолитическому разрушению).

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает конкретные мутации полипептида ALK4 и/или полипептида ActRIIB с тем, чтобы изменять гликозилирование полипептида. Такие мутации можно выбирать с тем, чтобы вводить или устранять один или несколько участков гликозилирования, таких как участки О-связанного или N-связанного гликозилирования. Участки узнавания аспарагин-связанного гликозилирования в целом содержат трипептидную последовательность, аспарагин-Х-треонин или аспарагин-Х-серин (где "Х" представляет собой какую-либо аминокислота), которую специфически узнают подходящие клеточные ферменты гликозилирования. Изменение также можно выполнять посредством добавления одного или нескольких остатков серина или треонина, или замены на них, в последовательности полипептида (для О-связанных участков гликозилирования). Различные замены или делеции аминокислот в одном или обоих из первого или третьего аминокислотных положений участка узнавания гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) ведут к отсутствию гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другие средства увеличения числа молекул углеводов на полипептиде опосредованы на химическом или ферментативном сопряжении гликозидов с полипептидом. В зависимости от используемого способа сопряжения, сахар (сахара) можно прикреплять к (а) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным сульфгидрильным группам, такие как у цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как у серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как у фенилаланина, тирозина или триптофана; или (f) амидной группе глутамина. Удаление одной или нескольких молекул углеводов, присутствующих на полипептиде, можно выполнять химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование может включать, например, воздействие на полипептид соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка ведет к отщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), при этом оставляя аминокислотную последовательность интактной. Ферментативного отщепления молекул углеводов от полипептидов можно достичь с помощью различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al. [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]. Последовательность полипептида можно корректировать, в зависимости от ситуации, в зависимости от типа используемой экспрессирующей системы, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут вводить различные паттерны гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. В целом, гетеромерные комплексы по настоящему раскрытию для использования у человека можно экспрессировать в клеточной линии млекопитающего, которая обеспечивает надлежащее гликозилирование, такой как клеточная линия HEK293 или CHO, хотя предположительно другие экспрессирующие клеточные линии млекопитающих также эффективны.

Настоящее раскрытие дополнительно предусматривает способ создания мутантов, в частности групп комбинаторных мутантов полипептида ALK4 и/или ActRIIB, а также усеченных мутантов. Объединенные препараты комбинаторных мутантов, в частности, можно использовать для идентификации функционально активных (например, связывающих лиганд суперсемейства TGF- β) последовательностей ALK4 и/или ActRIIB. Цель скрининга таких комбинаторных библиотек может состоять в том, чтобы создавать, например, варианты полипептидов, которые имеют измененные свойства, такие как измененная фармакокинетика или измененное связывание лигандов. Различные скрининговые анализы предоставлены далее, и такие анализы можно использовать для того, чтобы оценивать варианты. Например, можно

осуществлять скрининг вариантов комплекса ALK4:ActRIIB на способность связываться с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β для того, чтобы предотвращать связывание лиганда суперсемейства TGF- β с рецептор суперсемейства TGF- β и/или мешать передаче сигнала, обусловленной лигандом суперсемейства TGF- β .

Активность гетеромультимера ALK4:ActRIIB можно тестировать, например, в анализе на основе клеток или *in vivo*. Например, можно оценивать эффект гетеромультимера ALK4:ActRIIB, оказываемый на экспрессию генов или активность белков, участвующих в образовании мышц, в мышечной клетке. При необходимости, это можно выполнять в присутствии одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β , и клетки можно трансфицировать с тем, чтобы получать гетеромультимер ALK4:ActRIIB, и необязательно, лиганд суперсемейства TGF- β . Аналогичным образом, гетеромультимер ALK4:ActRIIB можно вводить мышам или другому животному, и можно оценивать одно или несколько измерений, таких как формирование и сила мышцы, используя принятые в данной области способы. Аналогичным образом, активность гетеромультимера ALK4:ActRIIB или его варианта можно тестировать, например, в остеообластях, адипоцитах и/или нервных клетках на предмет какого-либо эффекта, оказываемого на рост этих клеток, например, посредством анализов, как раскрыто в настоящем описании, и того, что является общими сведениями в данной области. SMAD-чувствительный репортер ген можно использовать в таких клеточных линиях для того, чтобы осуществлять мониторинг эффектов, оказываемых на передачу сигнала ниже по каскаду.

Можно создавать комбинаторно-полученные варианты, которые имеют увеличенную избирательность или в целом увеличенную активность в отношении эталонного гетеромультимера ALK4:ActRIIB. Такие варианты, когда их экспрессируют с рекомбинантных конструкций ДНК, можно использовать в протоколах генной терапии. Аналогичным образом, мутагенез может давать начало вариантам, которые имеют внутриклеточное время полужизни, значительно отличное от соответствующего немодифицированного гетеромультимера ALK4:ActRIIB. Например, измеренный белок можно делать более стабильным или менее стабильным при протеолитическом разрушении или других клеточных процесса, которые ведут к разрушению или иной инактивации немодифицированного полипептида. Такие варианты и гены, которые кодируют их, можно использовать для изменения уровней полипептидного комплекса посредством модуляции времени полужизни полипептида. Например, короткое время полужизни может давать начало более кратковременным биологическим эффектам и, являясь частью индуцибельной экспрессирующей системы, может допускать более жесткий контроль уровней рекомбинантного полипептидного комплекса в клетке. В Fc слитом белке мутации можно создавать в линкере (если уместно) и/или Fc части, чтобы изменять одну или несколько активностей гетеромультимера ALK4:ActRIIB, включая, например, иммуногенность, время полужизни и растворимость.

Комбинаторную библиотеку можно получать посредством вырожденной библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых содержит по меньшей мере часть потенциальных последовательностей ALK4 и/или ActRIIB. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативно лигировать в последовательности генов так, что вырожденный набор потенциальных кодирующих нуклеотидных последовательностей ALK4 и/или ActRIIB можно экспрессировать в виде отдельных полипептидов или альтернативно в качестве набора более крупных слитых белков (например, для фагового дисплея).

Существует множество путей, которыми можно создавать библиотеку потенциальных гомологов из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной последовательности гена можно осуществлять в автоматическом синтезаторе ДНК, и затем синтетические гены можно лигировать в подходящий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в данной области [Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ред. AG Walton, Amsterdam: Elsevier стр. 273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; и Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477]. Такие способы используют в направленной эволюции других белков [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 патентах США №№ 5223409, 5198346 и 5096815].

Альтернативно, другие формы мутагенеза можно использовать для того, чтобы создавать комбинаторную библиотеку. Например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB можно создавать и выделять из библиотеки посредством скрининга, например, с использованием сканирующего аланинового мутагенез [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 линкерного сканирующего мутагенеза [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 [Meyers et al., (1986) *Science* 232:613]; посредством ПЦР мутагенеза [Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19]; или посредством случайного мутагенеза, включая химический мутагенез [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]. Линкерный сканирующий мутагенез, в частности, в комбинаторном случае, представляет собой привлекательный способ идентификации усеченных (биологически активных) форм полипептидов ALK4 и/или ActRIIB.

Широкий диапазон способов известен в данной области для скрининга продуктов генов комбинаторных библиотек, полученных посредством точечных мутаций и усечений, и, с этой точки зрения, для скрининга кДНК библиотек на предмет продуктов генов, обладающих определенным свойством. Такие способы в целом можно адаптировать к быстрому скринингу библиотек генов, созданных посредством комбинаторного мутагенеза гетеромультимеров ALK4:ActRIIB. Наиболее широко используемые способы скрининга больших библиотек генов обычно включают клонирование библиотеки генов в реплицируемые экспрессирующие векторы, трансформацию подходящих клеток получаемой библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых обнаружение желаемой активности содействует относительно простому выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого обнаруживали. Предпочтительные анализы включают анализы связывания 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 ВС, активин АЕ, активин ВЕ, NODAL, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty) и/или анализы передачи клеточных сигналов, опосредованных лигандом TGF- β .

В определенных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB дополнительно могут содержать посттрансляционные модификации в дополнение к любым, которые естественным образом присутствуют в полипептиде ALK4 и/или ActRIIB. Такие модификации включают, но не ограничиваясь этим, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование. Как результат, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать неаминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, полисахарид или моносахарид и фосфаты. Эффекты таких неаминокислотных элементов, оказываемые на функциональность гетеромультимерного комплекса, можно тестировать, как раскрыто в настоящем описании для других вариантов гетеромультимеров. Когда полипептид по раскрытию получают в клетках посредством расщепления растущей формы полипептида, посттрансляционный процессинг также может быть важным для корректной укладки и/или функционирования белка. Различные клетки (например, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) обладают специфичными клеточными аппаратами и характерными механизмами для таких посттрансляционных активностей, и их можно выбирать, чтобы обеспечивать правильную модификацию и процессинг полипептида ALK4 и/или ActRIIB, а также гетеромультимеров, которые содержат их.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры, описанные в настоящем описании, содержат по меньшей мере один полипептид ALK4, ассоциированный, ковалентно или нековалентно по меньшей мере с одним полипептидом ActRIIB. Предпочтительно полипептиды, описанные в настоящем описании, формируют гетеродимерные комплексы, несмотря на то, что также включены гетеромультимерные комплексы более высокого порядка, такие как, но не ограничиваясь этим, гетеротримеры, гетеротетрамеры и дополнительные олигомерные структуры (см., например, фиг. 1, 2 и 8-10). В некоторых вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB содержат по меньшей мере один мультимеризационный домен. Как раскрыто в настоящем описании, термин "мультимеризационный домен" относится к аминокислоте или последовательности аминокислот, которые содействуют ковалентному или нековалентному взаимодействию между по меньшей мере первым полипептидом и по меньшей мере вторым полипептидом. Полипептиды, описанные в настоящем описании, можно соединять ковалентно или нековалентно в мультимеризационный домен. Предпочтительно, мультимеризационный домен содействует взаимодействию между первым полипептидом (например, полипептидом ALK4) и вторым полипептидом (например, полипептидом ActRIIB) для того, чтобы содействовать формированию гетеромультимера (например, формированию гетеродимера), и необязательно препятствует или иным образом не благоприятствует формированию гомомультимера (например, формированию гомодимера), тем самым увеличивая выход желаемого гетеромультимера (см., например, фиг. 2).

Многие известные в данной области способы можно использовать для того, чтобы создавать гетеромультимеры ALK4:ActRIIB. Например, не встречающиеся в природе дисульфидные связи можно конструировать посредством замены в первом полипептиде (например, полипептиде ALK4) встречающейся в природе аминокислоты на содержащий свободный тиол остаток, такой как цистеин, так, что свободный тиол взаимодействует с другим содержащим свободный тиол остатком во втором полипептиде (например, полипептиде ActRIIB) так, что происходит формирование дисульфидной связи между первым и вторым полипептидами. Дополнительные примеры взаимодействий для того, чтобы содействовать формированию гетеромультимера, включают, но не ограничиваясь этим, ионные взаимодействия, такие как описано в Kjaergaard et al., WO 2007147901; электростатические направляющие эффекты, такие как описано в Kannan et al., U.S. 8592562; взаимодействия суперспиралей, такие как описано в Christensen et al., U.S.20120302737; лейциновые молнии, такие как описано в Pack & Plueckthun, (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584; и мотивы спираль-поворот-спираль, такие как описано в Pack et al., (1993) *Bio/ Technology* 11:

1271-1277. Связь различных сегментов можно получать, например, через ковалентное связывание, например, посредством химической сшивки, пептидных линкеров, дисульфидных мостиков и т.д., или аффинных взаимодействий например, с помощью авидина-биотина или технологии лейциновой молнии.

В определенных аспектах, мультимеризационный домен может содержать один компонент взаимодействующей пары. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, описанные в настоящем описании, могут формировать белковые комплексы, содержащие первый полипептид, ковалентно или нековалентно связанный со вторым полипептидом, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида ALK4 и аминокислотную последовательность первого элемента взаимодействующей пары; и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида ActRIIB и аминокислотную последовательность второго элемента взаимодействующей пары. Взаимодействующая пара может представлять собой какие-либо две полипептидные последовательности, которые взаимодействуют для того, чтобы формировать комплекс, в частности, гетеродимерный комплекс, несмотря на то, что в работающих вариантах осуществления также можно использовать взаимодействующую пару, которая может формировать гомодимерный комплекс. Один элемент взаимодействующей пары можно сливать с полипептидом ALK4 или ActRIIB, как раскрыто в настоящем описании, включая, например, полипептидную последовательность, содержащую, состоящую по существу из или состоящую 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 последовательности какой-либо одной из SEQ ID №№ 2, 3, 5, 6, 10 и 20. Взаимодействующую пару можно выбирать для того, чтобы придавать усовершенствованное свойство/активность, такое как увеличенное время полужизни в сыворотке, или для того, чтобы действовать в качестве адаптера, к которому прикрепляют другой фрагмент для того, чтобы обеспечить усовершенствованное свойство/активность. Например, полиэтиленгликолевый фрагмент можно прикреплять к одному или обоим компонентам взаимодействующей пары для того, чтобы обеспечить усовершенствованное свойство/активность, такие как усовершенствованное время полужизни в сыворотке.

Первый и второй элементы взаимодействующей пары могут представлять собой асимметричную пару, что обозначает, что элементы пары предпочтительно ассоциируют друг с другом вместо самоассоциации. Соответственно, первый и второй элементы асимметричной взаимодействующей пары могут ассоциировать для того, чтобы формировать гетеродимерный комплекс (см., например, фиг. 2). Альтернативно, взаимодействующая пара может быть ненаправляемой, что обозначает, что элементы пары могут ассоциировать друг с другом или самоассоциироваться без существенного предпочтения и, таким образом, могут иметь одинаковые или различные аминокислотные последовательности. Соответственно, первый и второй элементы ненаправляемой взаимодействующей пары могут ассоциировать для того, чтобы формировать гомодимерный комплекс или гетеродимерный комплекс. Необязательно, первый элемент взаимодействующей пары (например, асимметричной пары или ненаправляемой взаимодействующей пары) ассоциирует ковалентно со вторым элементом взаимодействующей пары. Необязательно, первый элемент взаимодействующей пары (например, асимметричной пары или ненаправляемой взаимодействующей пары) ассоциирует нековалентно со вторым элементом взаимодействующей пары.

В качестве конкретных примеров, настоящее раскрытие предусматривает слитые белки, содержащие ALK4 или ActRIIB, слитый с полипептидом, содержащим константный домен иммуноглобулина, такой как домен CH₁, CH₂ или CH₃ иммуноглобулина или Fc-домен. Fc-домены, полученные из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, предусмотрены в настоящем описании. Известны другие мутации, которые снижают активность CDC или ADCC, и, в совокупности, какие-либо из этих вариантов включены раскрытие, и их можно использовать в качестве благоприятных компонентов гетеромультимерного комплекса по раскрытию. Необязательно, Fc-домен IgG1 из SEQ ID № 31 имеет одну или несколько мутаций в остатках, таких как Asp-265, Lys-322 и Asn-434 (нумерация в соответствии с соответствующим полно-размерным IgG1). В определенных случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asp-265), имеет сниженную способность связывания рецептора Fc γ относительно Fc-домена дикого типа. В других случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asn-434), обладает повышенной способностью связывания с Fc-рецептором (FcRN), родственным MHC I класса, относительно Fc-домена дикого типа.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc части IgG1 человека (G1Fc), приведен далее (SEQ ID № 31). Штриховое подчеркивание обозначает шарнирную область, и сплошное подчеркивание обозначает положения со встречающимися в природе вариантами. Отчасти, раскрытие предусматривает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID № 31. Встречающиеся в природе варианты в G1Fc включают E134D и M136L в соответствии с системой нумерации, используемой в SEQ ID № 31 (см. Uniprot P01857).

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 31)

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc части IgG2 человека (G2Fc), приведен далее (SEQ ID № 32). Штриховое подчеркивание обозначает шарнирную область и двойное подчеркивание обозначает положения, где в последовательности имеют место противоречия с базой данных (в соответствии с UniProt P01859). Отчасти, раскрытие предусматривает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID № 32.

1 VECPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
 51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
 101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 151 SDIAVEWESN GPENNYKTT PMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 201 CSVMHEALHN HNTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 32)

Два примера аминокислотных последовательностей, которые можно использовать для Fc части IgG3 человека (G3Fc), приведены далее. Шарнирная область в G3Fc может быть до четырех раз длиннее других Fc цепей и содержит три идентичных сегмента по 15 остатков, которым предшествует схожий сегмент из 17 остатков. Первая последовательность G3Fc, представленная далее (SEQ ID № 33), содержит короткую шарнирную область, состоящую из одного сегмента в 15 остатков, тогда как вторая последовательность G3Fc (SEQ ID № 34) содержит полноразмерную шарнирную область. В каждом случае штриховое подчеркивание обозначает шарнирную область и сплошное подчеркивание обозначает положения со встречающимися в природе вариантами в соответствии с UniProt P01859. Отчасти, раскрытие предусматривает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID №№ 33 и 34.

1 EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 51 VSHEDPEVQF KWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
 101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSL S LSP GK (SEQ ID № 33)
 1 ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
 51 SCDTPPPCPR CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
 101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLT V LHQDWLNGKE
 151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
 201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
 251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSL S LSPGK (SEQ ID № 34)

Встречающиеся в природе варианты в G3Fc (например, см. Uniprot P01860) включают E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y, если конвертировать в систему нумерации, используемую в SEQ ID № 33, и настоящее раскрытие предусматривает слитые белки, содержащие G3Fc-домены, содержащие одну или несколько из этих вариаций. Кроме того, ген иммуноглобулина IgG3 человека (IGHG3) демонстрирует структурный полиморфизм, который характеризуется различными длинами шарнира [см. Uniprot P01859]. В частности, вариант WIS не имеет большей части участка V и весь участок CH₁. Он имеет дополнительную межцепную дисульфидную связь в положении 7 в дополнение к 11, обычно присутствующему в шарнирной области. Вариант ZUC не содержит большей части участка V, весь участок CH₁ и часть шарнира. Вариант ОММ может представлять аллельную форму или γ цепь другого подкласса. Настоящее раскрытие предусматривает дополнительные слитые белки, содержащие G3Fc-домены, содержащие один или несколько из этих вариантов.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc части IgG4 человека (G4Fc), приведен далее (SEQ ID № 35). Штриховое подчеркивание обозначает шарнирную область. Отчасти, раскрытие предусматривает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID № 35.

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVDSQ
 51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
 101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
 151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
 201 EGNVFCSCVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID № 35)

Различные сконструированные мутации в Fc-домене представлены в настоящем описании в отношении последовательности G1Fc (SEQ ID № 31), и аналогичные мутации в G2Fc, G3Fc и G4Fc можно получать из их выравнивания с G1Fc на фиг. 5. Из-за неодинаковой длины шарнира, аналогичные положения в Fc на основании изотипического выравнивания (фиг. 5) имеют различные номера аминокислот в SEQ ID №№ 31, 32, 33, 34 и 35. Также следует принимать во внимание, что данное аминокислотное положение в последовательности иммуноглобулина, состоящей из участков шарнира, CH₂ и CH₃ (например, SEQ ID №№ 31, 32, 33, 34 и 35), будет идентифицировано с помощью другого номера, чем то же положение, когда нумерация охватывает весь константный домен тяжелой цепи IgG1 (состоящий из участков CH₁, шарнира, CH₂ и CH₃), как в базе данных Uniprot. Например, соответствие между выбранными положениями CH₃ в последовательности G1Fc человека (SEQ ID № 31), константном домене тяжелой цепи IgG1 человека (Uniprot P01857) и тяжелой цепи IgG1 человека представляет собой следующее.

Соответствие положений CH ₃ в различных системах нумерации		
G1Fc (нумерация начинается в первом треонине в шарнирной области)	Константный домен тяжелой цепи IgG1 (нумерация начинается в CH ₁)	Тяжелая цепь IgG1 (схема нумерации EU по 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. (ред.) 1991; стр. 688-696 в Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., том 1, NIH, Bethesda, MD.

Проблема, которая возникает при крупномасштабном получении белков на основе асимметричных иммуноглобулинов из одной клеточной линии известна как "проблема ассоциации цепей". Очевидно, что при получении биспецифических антител сталкиваются с проблемой ассоциации цепей, которая относится к задаче эффективного получения желаемого белка из нескольких цепей среди множества комбинаций, которые неотъемлемо возникают, когда различные тяжелые цепи и/или легкие цепи получают в одной клеточной линии [Klein et al (2012) mAbs 4:653-663]. Эта проблема стоит наиболее остро, когда две различные тяжелых цепи и две различные легкие цепи получают в одной и той же клетке, в этом случае существует всего 16 возможных комбинаций цепей (хотя некоторые из них идентичны), тогда как желаемой обычно является только одна. Тем не менее, тот же принцип объясняет сниженный выход желаемого слитого белка из нескольких цепей, который содержит только две различные (асимметричные) тяжелые цепи.

В данной области известны различные способы, которые увеличивают образование желаемых пар Fc-содержащих слитых полипептидных цепей в одной клеточной линии для того, чтобы получать предпочтительный асимметричный слитый белок с приемлемым выходом [Klein et al (2012) mAbs 4:653-663; и Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]. Способы достижения образования желаемых пар Fc-содержащих цепей включают, но не ограничиваясь этим, образование пар на основе зарядов (электростатическое управление), стерическое образование пар "выступы-во-впадины", образование пар SEEDbody и образование пар на основе лейциновой молнии [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 раскрыто в настоящем описании, эти способы можно использовать для того, чтобы создавать гетеромультимерные комплексы ALK4-Fc:ActRIIB-Fc.

См. фиг. 8-10.

Например, одно средство, с помощью которого можно содействовать взаимодействию между специфичными полипептидами, связано с конструированием комплементарных участков выпуклость-в-полость (выступ во впадину), таких как описано в Agathoon et al., U.S.7183076 и Carter et al., U.S.5731168. "Выпуклости" конструируют посредством замены небольших боковых цепей аминокислот из области контакта первого полипептида (например, первой взаимодействующей пары) на более крупные боковые цепи (например, тирозина или триптофана). Комплементарные "полости" размера, идентичного или схожего с выпуклостями, необязательно создают в области контакта второго полипептида (например, второй взаимодействующей пары) посредством замены крупных боковых цепей аминокислот на менее крупные (например, аланина или треонина). Когда выпуклость или полость с подходящим расположением и размерами существует в области контакта первого или второго полипептида, необходимо только конструировать соответствующую полость или выпуклость, соответственно, в смежной области контакта.

При нейтральном pH (7,0), аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота заряжены отрицательно, а лизин, аргинин и гистидин заряжены положительно. Эти заряженные остатки можно использовать для того, чтобы содействовать формированию гетеродимера и одновременно затруднять формирование гомодимера. Притягивающие взаимодействия имеют место между противоположными зарядами, а отталкивающие взаимодействия возникают между одноименными зарядами. Отчасти, в белковых комплексах, описанных в настоящем описании, используют притягивающие взаимодействия для содействия формированию гетеромультимера (например, формированию гетеродимера) и необязательно отталкивающие взаимодействия для затруднения формирования гомодимера (например, формирования гомодимера) посредством проведения сайт-специфического мутагенеза заряженных остатков области контакта.

Например, область контакта домена CH₃ IgG1 содержит четыре уникальные пары заряженных остатков, участвующих в домен-доменных взаимодействиях: Asp356-Lys439', Glu357-Lys370', Lys392-Asp399' и Asp399-Lys409' [нумерация остатков во второй цепи обозначена ']. Следует отметить, что используемая здесь схема нумерации для обозначения остатков в домене CH₃IgG1 соответствует схеме нумерации EU по Kabat. Из-за симметрии второго порядка, присутствующей во взаимодействиях доменов CH₃-CH₃, каждое уникальное взаимодействие будет представлено в структуре два раза (например, Asp399-Lys409' и Lys409-Asp399'). В последовательности дикого типа, K409-D399' благоприятствует формированию как гетеродимера, так и гомодимера. Одна мутация, переключающая полярность заряда (например, K409E; положительный заряд на отрицательный) в первой цепи ведет к неблагоприятным взаимодействиям для формирования гомодимера первой цепи. Неблагоприятные взаимодействия возникают из-за отталкивающих взаимодействий, возникающих между одноименными зарядами (отрицательный-отрицательный; K409E-D399' и D399-K409E'). Схожая мутация, переключающая полярность заряда (D399K'; отрицательный на положительный) во второй цепи ведет к неблагоприятным взаимодействиям (K409'-D399K' и D399K-K409') для формирования гомодимера второй цепи. Но одновременно эти две мутации (K409E и D399K') ведут к благоприятным взаимодействиям (K409E-D399K' и D399-K409') для формирования гетеродимера.

Эффект электростатического управления, оказываемый на формирование гетеродимера и препятствование гомодимеру, дополнительно можно усиливать посредством мутации дополнительных заряженных остатков, которые могут образовывать или могут не образовывать пары с противоположно заряженным остатком во второй цепи, включая, например, Arg355 и Lys360. Ниже в таблице перечислены возможные мутации изменения заряда, которые можно использовать, отдельно или в комбинации, для усиления формирования гетеромультимера ALK4:ActRIIB.

Примеры парных мутаций заряженных остатков для усиления формирования 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 образуют область контакта $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ в слитом белке по данной заявке, заменяют на заряженную аминокислоту так, что взаимодействие становится электростатически неблагоприятным. Например, положительно заряженную аминокислоту в области контакта (например, лизин, аргинин или гистидин) заменяют на отрицательно заряженную аминокислоту (например, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту). Альтернативно, или в комбинации с вышеупомянутой заменой, отрицательно заряженную аминокислоту в области контакта заменяют на положительно заряженную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления аминокислоту заменяют на не встречающуюся в природе аминокислоту, имеющую желаемую характеристику заряда. Следует отметить, что мутация отрицательно заряженных остатков (Asp или Glu) в His приведет к увеличению объема боковой цепи, что может вызывать стерические проблемы. Кроме того, форма His как донора и акцептора протона зависит от локального окружения. Эти вопросы следует учитывать в стратегии конструирования. Поскольку остатки области контакта высоко консервативны в подклассах IgG человека и мыши, эффекты электростатического управления, описанные в настоящем описании, можно применять к IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека и мыши. Эту стратегию также можно расширять для того, чтобы модифицировать незаряженные остатки в заряженные остатки в области контакта домена CH_3 .

Отчасти, раскрытие предусматривает образование желаемых пар асимметричных Fc-содержащих полипептидных цепей с использованием последовательностей Fc, сконструированных так, чтобы быть комплементарными на основании образования пар зарядов (электростатическое управление). Одну из пары последовательностей Fc с электростатической комплементарностью можно произвольно сливать с полипептидом ALK4 или ActRIIB из конструкции, с использованием или без использования необязательного линкера, чтобы создавать гетеромультимер ALK4:ActRIIB. Эту отдельную цепь можно совместно экспрессировать в клетке, предпочтительно наряду с последовательностью Fc, комплементарной первому Fc, чтобы содействовать образованию желаемой конструкции из нескольких цепей (например, гетеромультимера ALK4:ActRIIB). В этом примере на основании электростатического управления, SEQ ID № 23 [G1Fc человека (E134K/D177K)] и SEQ ID № 24 [G1Fc человека (K170D/K187D)] представляют собой примеры комплементарных последовательностей Fc, в которых сконструированные замены аминокислот имеют двойное подчеркивание, и полипептид рецептора суперсемейства TGF- β I типа или II типа из конструкции можно сливать с SEQ ID № 2 3 или SEQ ID № 24, но не с обоими. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, следует принимать во внимание, что замены аминокислот в соответствующих положениях в hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) будут создавать комплементарные пары Fc, которые можно использовать вместо комплементарной пары hG1Fc далее (SEQ ID №№ 2 3 и 24).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRQEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLKSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 23)

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPPVLDSDG SFFLYSDLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 24)

```

Отчасти раскрытие предусматривает образование желаемых пар асимметричных Fc-содержащих полипептидных цепей с использованием последовательностей Fc, сконструированных для стерической комплементарности. Отчасти раскрытие предусматривает образование пар "выступы-во-впадины" в качестве примера стерической комплементарности. Одну из пары последовательностей Fc со стерической комплементарностью можно произвольно сливать с полипептидом ALK4 или ActRIIB из конструкции, с использованием или без использования необязательного линкера, чтобы создавать гетеромультимер ALK4:ActRIIB. Эту отдельную цепь можно совместно экспрессировать в предпочтительной клетке наряду с последовательностью Fc, комплементарной первой Fc, чтобы способствовать образованию желаемой конструкции из нескольких цепей. В этом примере, основанном на образовании пар "выступы-во-впадины", SEQ ID № 25 [G1Fc(T144Y) человека] и SEQ ID № 26 [G1Fc(Y185T) человек] являются примерами комплементарных последовательностей Fc, в которых сконструированные замены аминокислот имеют двойное подчеркивание, и полипептид ALK4 или ActRIIB из конструкции можно сливать с SEQ ID № 25 или SEQ ID № 26, но не с обоими. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc,

следует принимать во внимание, что замены аминокислот в соответствующих положениях в hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5) позволят создавать комплементарные пары Fc, которые можно использовать вместо комплементарной пары hG1Fc, представленной далее (SEQ ID №№ 25 и 26).

```
1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLYCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 25)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 26)
```

Пример комплементарности Fc на основании образования пар "выступы-во-впадины" в сочетании со сконструированной дисульфидной связью, раскрыт в SEQ ID № 27 [hG1Fc(S132C/T144W)] и SEQ ID № 28 [hG1Fc(Y127C/T144S/L146A/Y185V)].

Сконструированные замены аминокислот в этих последовательностях имеют двойное подчеркивание, и полипептид I типа или II типа суперсемейства TGF- β из конструкции можно сливать с SEQ ID № 27 или SEQ ID № 28, но не с обеими. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, следует принимать во внимание, что замены аминокислот в соответствующих положениях в hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5), позволят создавать комплементарные пары Fc, которые можно использовать вместо комплементарной пары hG1Fc, представленной далее (SEQ ID №№ 27 и 28).

```
1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P CREEMTKNQ VSLWCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 27)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID № 28)
```

Отчасти, раскрытие предусматривает образование желаемых пар асимметричных Fc-содержащих полипептидных цепей с использованием последовательностей Fc, сконструированных для того, чтобы создавать переплетающиеся сегментов β -тяжелой доменов CH₃ IgG и IgA человек. Такие способы включают использование гетеродимеров сконструированных доменов CH₃ с заменой тяжелой (SEED), допускающих формирование слитых белков SEEDbody [Davis et al. (2010) Protein Eng Design Sel 23:195-202]. Одну из пары последовательностей Fc с комплементарностью SEEDbody можно произвольно сливать с ALK4 или ActIIB из конструкции, с использованием или без использования необязательного линкера, чтобы создавать слитый полипептид ALK4 или ActRIIB. Эту отдельную цепь можно совместно экспрессировать в предпочтительной клетке наряду с последовательностью Fc, комплементарной первому Fc для того, чтобы способствовать созданию желаемой конструкции из нескольких цепей. В этом примере на основании образования пар SEEDbody (Sb), SEQ ID № 29 [hG1Fc (SbAG)] и SEQ ID № 30 [hG1Fc (SbGA)] являются примерами комплементарных последовательностей Fc IgG, в которых сконструированные замены аминокислот из Fc IgA имеют двойное подчеркивание, и полипептид ALK4 или ActRIIB из конструкции можно сливать с SEQ ID № 29 или SEQ ID № 30, но не с обеими. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, следует принимать во внимание, что замены аминокислот в соответствующих положениях в hG1Fc, hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5), позволят создавать мономер Fc, который можно использовать в комплементарной паре IgG-IgA, представленной далее (SEQ ID №№ 29 и 30).

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PFRPEVHLLP PSREEMTKNQ VSLTCLARGF
 151 YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTPSRQEPSQ GTTTFAVTSK LTVDKSRWQQ
 201 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK (SEQ ID № 29)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PESEELALNE LVTLTCLVKG
 151 FYPSDIAVEW ESNGOELPRE KYLTWAPVLD SDGSFFLYSI LRVAEDWKK
 201 GDTFSCSVMH EALHNHYTQK SLDRSPGK (SEQ ID № 30)

Отчасти, раскрытие предусматривает образование желаемых пар асимметричных Fc-содержащих полипептидных цепей с расщепляемым доменом лейциновой молнии, прикрепленным к С-концу доменов CH₃ Fc. Прикрепления лейциновой молнии достаточно для того, чтобы вызывать предпочтительную сборку гетеродимерных тяжелых цепей антител [Wranik et al (2012) J Biol Chem 287:43331-43339]. Как раскрыто в настоящем описании, одну из пары последовательностей Fc, прикрепленную к формирующей лейциновую молнию нити, можно произвольно сливать с полипептидом ALK4 или ActRIIB из конструкции, с использованием или без использования необязательного линкера, чтобы создавать слитый полипептид ALK4 или ActRIIB. Эту отдельную цепь можно совместно экспрессировать в предпочтительной клетке вместе с последовательностью Fc, прикрепленной к комплементарной формирующей лейциновую молнию нити, чтобы способствовать образованию желаемой конструкции из нескольких цепей. Протеолитическое расщепление конструкции бактериальной эндометаллопротеиназой Lys-C после очистки может высвободить домен лейциновой молнии, что ведет к конструкции Fc, структура которой идентична таковой у нативного Fc. В этом примере на основании образования пар с лейциновой молнией, SEQ ID № 36 [hG1Fc-Ap1 (кислая)] и SEQ ID № 37 [hG1Fc-Bp1 (основная)] являются примерами комплементарных последовательностей Fc IgG, в которых сконструированные комплементарные последовательности с лейциновой молнией подчеркнуты, и полипептид ALK4 или ActRIIB из конструкции можно сливать с SEQ ID № 36 или SEQ ID № 37, но не с обеими. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей между нативным hG1Fc, нативным hG2Fc, нативным hG3Fc и нативным hG4Fc, следует принимать во внимание, что формирующие лейциновую молнию последовательности, прикрепленные, с использованием или без использования необязательного линкера, к hG1Fc, hG2Fc, hG3Fc или hG4Fc (см. фиг. 5), будут создавать мономер Fc, который можно использовать в комплементарной формирующей лейциновую молнию паре, представленной далее (SEQ ID №№ 36 и 37).

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL LSPGKGGSAQ LEKELQALEK ENAQLEWELQ
 251 ALEKELAQGA T (SEQ ID № 36)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL LSPGKGGSAQ LKKKLOALKK KNAQLKWKLQ
 251 ALKKKLAQGA T (SEQ ID № 37)

Как описано выше, в данной области известны различные способы, которые повышают образование желаемых пар Fc-содержащих слитых полипептидных цепей в одной клеточной линии для того, чтобы получать предпочтительный асимметричный слитый белок 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 ALK4:ActRIIB можно создавать с использованием комбинации слитых белков тяжелых и легких цепей, содержащих полипептид ALK4 или ActRIIB. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид ALK4 можно сливать, с использованием или без использования линкерного домена, с тяжелой цепью иммуноглобулина (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1 или IgA2), которая содержит по меньшей мере часть домена CH₁. Аналогичным образом, полипептид ActRIIB можно сливать, с использованием

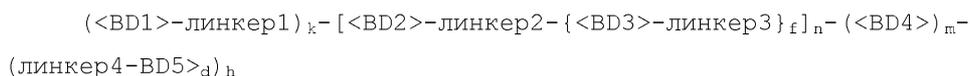
или без использования линкерного домена, с легкой цепью иммуноглобулина (каппа или лямбда), которая содержит по меньшей мере часть константного домена легкой цепи (C_L). В альтернативных вариантах осуществления полипептид ActRIIB можно сливать, с использованием или без использования линкерного домена, с тяжелой цепью иммуноглобулина (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1 или IgA2), которая содержит по меньшей мере часть домена CH_1 , и полипептид ALK4 можно сливать, с использованием или без использования линкерного домена, с легкой цепью иммуноглобулина (каппа или лямбда), которая содержит по меньшей мере часть константного домена легкой цепи (C_L). Эта конструкция обладает преимуществом в виде естественной способности тяжелых цепей образовывать гетеродимеры с легкими цепями. В частности, гетеродимеризация тяжелой и легкой цепи происходит между CH_1 и C_L , которые в целом стабилизируют ковалентная связь двух доменов через дисульфидный мостик. Конструкции, в которых используют полноразмерную тяжелую цепь или по меньшей мере часть тяжелой цепи, содержащей шарнирную область, могут давать начало антителоподобным молекулам, содержащим две "легкие цепи" и две "тяжелые цепи". См. фиг. 9. Возможное преимущество этой конструкции состоит в том, что она может более близко имитировать встречающийся в природе комплекс ALK4-лиганд-ActRIIB и может демонстрировать более высокую аффинность к лиганду, чем сравнимые отдельные гетеродимеры. В некоторых вариантах осуществления эту конструкцию можно модифицировать посредством введения различных усечений тяжелых цепей, включая, например, усечения, которые содержат домен CH_1 и целиком или частично шарнирный домен (отсюда берут начало $F(ab')_2$ -подобные молекулы), а также усечения, которые содержат только домен CH_1 или его фрагмент (отсюда берут начало Fab-подобные молекулы). См. фиг. 9G. Различные способы разработки 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 желательно создавать антителоподобные гетеродимеры ALK4:ActRIIB, содержащие по меньшей мере одну ветвь комплекса, который содержит гетеродимерную пару ALK4- C_L :ActRIIB- CH_1 , и по меньшей мере вторую ветвь, содержащую гетеродимерную пару ActRIIB- C_L : ALK4- CH_1 . См., например, фиг. 9B. Такие гетеродимерные комплексы можно создавать, например, с использованием комбинаций технологий образования асимметричных 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] ошибочное образование пар легких цепей преодолевают с использованием кроссоверов доменов и тяжелых цепей, гетеродимеризованных с использованием выступов-во-впадинах [Merchant et al (1998) Nat. Biotechnol. 16: 677-681]. Для кроссовера доменов переменные домены или константные домены меняют между легкой и тяжелой цепями для того, чтобы создавать два асимметричных Fab плеча, которые направляют когнатное образование пар легких цепей, при этом сохраняя структурную и функциональную целостность переменного домена [Fenn et al (2013) PLoS one 8: e61953]. Альтернативный подход к преодолению ошибочного образования пар легких цепей состоит в разработке тяжелых и легких цепей с ортогональными областями контакта Fab [Lewis (2014) Nat. Biotechnol. 32: 191-198]. Это выполняют с помощью вычислительного моделирования [Das et al (2008) Annu. Rev. Biochem. 77: 363-382] в комбинации с рентгеновской кристаллографией для того, чтобы идентифицировать мутации в областях контакта V_H/V_L и CH_1/C_L . Для гетеродимеров, создаваемых с использованием этого способа, может быть необходимо конструировать мутации в обеих областях контакта V_H/V_L и CH_1/C_L , чтобы минимизировать ошибочное образование пар тяжелых/легких цепей. Разработанную ортогональную область контакта Fab можно использовать в сочетании со стратегией гетеродимеризации тяжелых цепей для того, чтобы содействовать эффективному получению IgG в одной клетке-хозяине.

Электростатическое управление также можно использовать для того, чтобы создавать ортогональные области контакта Fab для того, чтобы содействовать конструкции таких гетеродимеров. Пептидные линкеры можно использовать для того, чтобы обеспечивать когнатное образование пар легких и тяжелых цепей в формате, известном как "LUZ-Y" [Wranik et al (2012) J. Biol. Chem. 287: 43331-43339], в котором гетеродимеризацию тяжелых цепей выполняют с использованием лейциновых молний, которые впоследствии можно удалять посредством протеолиза *in vitro*.

Альтернативно, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB могут содержать одну или несколько одноцепочечных ловушек для лигандов, как раскрыто в настоящем описании, которые необязательно могут быть ковалентно или нековалентно связаны с одним или несколькими полипептидами ALK4 или ActRIIB, а также дополнительные ALK4:ActRIIB одноцепочечные ловушки для лигандов [US 2011/0236309 и US 2009/0010879]. См. фиг. 12. Как раскрыто в настоящем описании, одноцепочечные ловушки для лигандов не требуют слияния с каким-либо мультимеризационным доменом, таким как суперспиральные Fc-домены, чтобы быть поливалентными. В целом, одноцепочечные ловушки для лигандов по настоящему раскрытию содержат по меньшей мере один домен полипептида ALK4 и один домен полипептида ActRIIB. Домены полипептидов ALK4 и ActRIIB, в целом, в настоящем описании называемые связывающими доменами (BD), необязательно можно соединять с помощью линкерного участка.

Например, в одном из аспектов, настоящее раскрытие предусматривает гетеромультимеры, которые содержат полипептид, имеющий следующую структуру:



где n и h независимой; d , f , m и k независимого, - BD1 , BD2 , BD3 , BD4 и BD5 независимо представляют собой домены полипептидов ALK4 или ActRIIB , где по меньшей мере один из BD1 , BD2 , BD3 и BD4 представляет собой домен полипептида ALK4 и где по меньшей мере один из BD1 , BD2 , BD3 , и BD4 представляет собой домен полипептида ActRIIB и линкер1, линкер2, линкер3 и линкер 4 независимого. В определенном варианте осуществления одноцепочечные ловушки ALK4:ActRIIB содержат по меньшей мере два различных полипептида ALK4 . В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные ловушки ALK4:ActRIIB содержат по меньшей мере два различных полипептида ActRIIB . В определенном варианте осуществления, одноцепочечные ловушки ALK4:ActRIIB содержат по меньшей мере два различных линкера. В зависимости от значений, выбранных для d , f , h , k , m и n , структура гетеромультимера может содержать большое число повторяющихся звеньев в различных комбинациях или может представлять собой относительно простую структуру.

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает гетеромультимеры, которые содержат полипептид, имеющий следующую структуру:



В еще одном аспекте настоящее раскрытие предусматривает гетеромультимеры, которые содержат полипептид, имеющий следующую структуру:



где $n \geq 1$.

Другой аспект изобретения предусматривает гетеромультимеры, которые содержат полипептид, имеющий следующую структуру:



где f и $g \geq 1$.

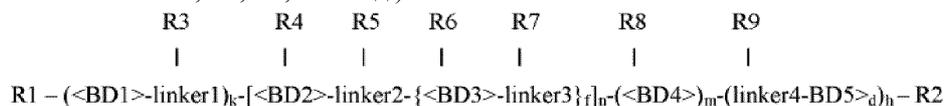
В одном из вариантов осуществления, где BD2 и BD3 представляют собой одно и то же и f и g представляют собой одно и то же число, это может вести по существу к зеркально симметричной структуре вокруг линкера 2, при условии различия линкеров. В случаях, когда BD2 отличается от BD3 и/или когда f и g представляют собой различные числа, будут получать различные структуры. В пределах способностей специалиста в данной области выбирать подходящие связывающие домены, линкеры и частоты повторения в свете раскрытия в настоящем описании и знаний в данной области. Конкретные неограничивающие примеры таких одноцепочечных ловушек для лигандов в соответствии с настоящим раскрытием представлены схематически на фиг. 11.

Линкеры (1, 2, 3 и 4) могут представлять собой одно и то же или различное. Линкерный участок предусматривает сегмент, который отличается от структурных лигандсвязывающих доменов ALK4 и ActRIIB , и, таким образом, его можно использовать для конъюгации со вспомогательными молекулами (например, молекулами, которые можно использовать при увеличении стабильности, такие как фрагменты для пегилирования), без химической модификации связывающих доменов. Линкер может содержать неструктурированную аминокислотную последовательность, которая может быть такой же как или получена из консервативных модификаций в последовательности природного неструктурированного участка во внеклеточной части рецептора для лиганда, представляющего интерес, или другого рецептора в суперсемействе $\text{TGF-}\beta$. В других случаях такие линкеры могут быть полностью искусственными по композиции и происхождению, но будут содержать аминокислоты, выбранные для того, чтобы предоставлять неструктурированный гибкий линкер с низкой вероятностью возникновения осложнений с электростатическими или стерическими затруднениями, когда его приводят в непосредственную близость с лигандом, представляющим интерес. Длину линкера считают приемлемой, когда она позволяет связывающим доменам, расположенным на каждом из N- и C-концов линкера, связываться с их природными сайтами связывания на их природном лиганде так, что, когда связаны оба связывающих домена, лиганд связан с более высокой аффинностью, чем он был бы связан при связывании только одним из связывающих доменов. В некоторых случаях, число аминокислотных остатков в линкере природного или искусственного происхождения выбирают равным или превышающим минимальное необходимое расстояние для одновременного (соединенного) связывания двух сайтов связывания на лиганде ALK4 и/или ActRIIB . Например, без ограничения, длина линкера может составлять между 1-10 аминокислотами, 10-20 аминокислотами, приблизительно 18-80 аминокислот, 25-60 аминокислот, 35-45 аминокислот или представлять собой какую-либо другую подходящую длину.

Линкеры можно разрабатывать для того, чтобы содействовать очистке полипептида. Конкретная выбранная схема очистки определяет, какие модификации необходимы, например, без ограничения, предусмотрено добавление "меток" для очистки, таких как гистидиновые метки; в других примерах линкер может содержать участки для того, чтобы содействовать добавлению переносимых или вспомогательных молекул. Когда такие добавки влияют на неструктурированную природу линкера или привносят потенциальные электростатические или стерические проблемы, следует выполнять подходящее увеличение длины линкера, чтобы гарантировать, что два связывающих домена способны связывать соответствующе

им сайты на лиганде. В свете способов и положений в настоящем описании, специалист в данной области может выполнять такое определение обычным образом.

Кроме того, данная конструкция позволяет привязывать другие переносимые молекулы (например, визуализирующие средства, такие как флуоресцентные молекулы), токсины и т.д. Например, без ограничения каким-либо образом, одноцепочечные полипептиды можно модифицировать для того, чтобы добавлять одну или несколько переносимых и/или вспомогательных молекул (совместно обозначаемых в настоящем описании как R1, R2, R3, R4 и т.д.):



Без ограничения, большинство заместителей R доступно, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 могут присутствовать или не присутствовать; когда присутствуют, они могут представлять собой одно и то же или различное, и могут независимо представлять собой одно или несколько из: слитого белка для направленного воздействия, например, но не ограничиваясь этим, такого как фрагмент антитела (например, одноцепочечный Fv) и/или однодоменное антитело (sdAb); радиотерапевтического и/или визуализирующего средства, например, но не ограничиваясь этим, радионуклид (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, Alexa Fluor, краситель Cy) и/или флуоресцентной белковой метки (например GFP, DsRed); цитотоксического средства для химиотерапии, например, но не ограничиваясь этим, производных доксорубина, калихимицина, майганзиноида (например DM1, DM4), токсина (например, усеченного эндотоксина A *Pseudomonas*, дифтерийного токсина); носителя на основе наночастиц, например, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоля (PEG), полимера, конъюгированного с лекарственным средством, наноносителя или визуализирующего средства (например, полимера N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HPMA), глутаминовой кислоты, PEG, декстрана); лекарственного средства (например, но не ограничиваясь этим, доксорубина, камптотецина, паклитаксела, палатината); наноносителя, например, но не ограничиваясь этим, нанооболочки или липосомы; визуализирующего средства, например, но не ограничиваясь этим, супермагнитного оксида железа (SPIO); дендримера; и/или твердого носителя для использования в очистке, концентрировании или селективной лиганды (например, наночастицы, инертные смолы, подходящие подложки из диоксида кремния).

В целом, не будет предпочтительно иметь переносимые или вспомогательные молекулы во всех возможных положениях, поскольку это может вызывать стерические или электростатические осложнения. Однако эффекты добавления переносимой или вспомогательной молекулы в какое-либо заданное положение или положения в структуре можно определять обычным образом в свете раскрытия в настоящем описании, моделируя линкер между связывающими доменами и осуществляя молекулярно-динамическую симуляцию, чтобы по существу минимизировать механическую энергию молекул и снизить стерическую и электростатическую несовместимость между линкером и полипептидами ALK4 и ActRIIB, как изложено в настоящем описании.

Может быть предпочтительно добавлять переносимую или вспомогательную молекулу в линкерную часть средства, скорее в связывающий домен, чтобы снижать вероятность препятствования функции связывания. Однако добавление в связывающий домен возможно и может быть желательным в некоторых случаях, и эффект такого добавления можно предварительно определять обычным образом посредством моделирования связывающего средства и линкера с предложенным добавлением, как раскрыто в настоящем описании.

Способы конъюгации можно осуществлять с использованием коммерческих наборов, которые делают возможной конъюгацию через обыкновенные реакционноспособные группы, такие как первичные амины, сложные сукцинимидиловые эфиры (NHS) и сульфгидрильные реакционноспособные группы. Некоторые неограничивающие примеры представляют собой: набор для мечения белков Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, технологии обнаружения Invitrogen) и наборы для пегилирования (Pierce Biotechnology Inc.).

В определенных аспектах одноцепочечные ловушки ALK4:ActRIIB можно ковалентно или нековалентно связывать с одним или несколькими полипептидами ALK4 или ActRIIB, как и дополнительные одноцепочечные ловушки ALK4:ActRIIB для лигандов, чтобы формировать гетеромультимеры более высокого порядка, которые можно использовать в соответствии со способами, описанными в настоящем описании. См., например, фиг. 12. Например, одноцепочечная ловушка для лигандов ALK4:ActRIIB дополнительно может содержать мультимеризационный домен, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные ловушки для лигандов ALK4:ActRIIB содержат константный домен иммуноглобулина Ig. Такие константные домены иммуноглобулинов можно выбирать для того, чтобы содействовать симметричным или асимметричным комплексам, содержащим по меньшей мере одну одноцепочечную ловушку ALK4:ActRIIB.

В определенных аспектах, одноцепочечная ловушка ALK4:ActRIIB или комбинации таких ловушек можно использовать в качестве антагонистов ALK4:ActRIIB для того, чтобы лечить или предотвращать

нарушение или заболевание ALK4:ActRIIB, как раскрыто в настоящем описании.

Понятно, что различные элементы слитых белков (например, слитые белки Fc иммуноглобулина) можно располагать любым образом, который соответствует желаемой функциональности. Например, домен полипептида ALK4 и/или ActRIIB можно помещать с С-конца от гетерологичного домена или альтернативно гетерологичный домен можно помещать с С-конца от домена полипептида ALK4 и/или ActRIIB. Домен полипептида ALK4 и/или ActRIIB и гетерологичный домен не обязаны находиться смежно в слитом белке, и дополнительные домены или аминокислотные последовательности могут быть включены с С- или N-конца от любого домена или между доменами.

Например, слитый белок рецептора ALK4 и/или ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, как изложено в формуле А-В-С. Часть В соответствует домену полипептида ALK4 или ActRIIB. Части А и С могут независимо представлять собой ноль, одну или больше чем одну аминокислоту, и обе части А и С, когда присутствуют, гетерологичны для В. Части А и/или С можно прикреплять к части В через линкерную последовательность. Линкер может быть богат остатками глицина (например, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 остатка глицина) или глицина и пролина и, например, может содержать одну последовательность треонина/серина и глицинов или повторяющиеся последовательности треонина/серина и/или глицинов, например, синглеты или повторы GGG (SEQ ID № 13), GGGG (SEQ ID № 14), TGGGG (SEQ ID № 15), SGGGG (SEQ ID № 16), TGGG (SEQ ID № 17), SGGG (SEQ ID № 18), или GGGGS (SEQ ID № 58). В определенных вариантах осуществления слитый белок ALK4 и/или ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, как изложено в формуле А-В-С, в которой А представляет собой лидерную (сигнальную) последовательность, В состоит из домена полипептида ALK4 и/или ActRIIB и С представляет собой полипептидную часть, которая усиливает одно или несколько из стабильности *in vivo*, времени полужизни *in vivo*, захвата/введения, локализации или распределения в тканях, формирования белковых комплексов и/или очистки. В определенных вариантах осуществления слитый белок ALK4 и/или ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, как изложено в формуле А-В-С, в которой А представляет собой лидерную последовательность ТРА, В состоит из полипептида домена рецептора ALK4 или ActRIIB и С представляет собой Fc-домен иммуноглобулина. Предпочтительные слитые белки содержат аминокислотную последовательность, изложенную в какой-либо одной из SEQ ID №№ 39, 41, 42, 44, 45, 46, 47 и 48.

В некоторых вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB дополнительно содержат одну или несколько гетерологичных частей (доменов) с тем, чтобы придавать желаемое свойство. Например, некоторые домены слияния являются особенно эффективными при выделении слитых белков посредством аффинной хроматографии. Общеизвестные примеры таких доменов слияния включают, но не ограничиваясь этим, полигистидин, Glu-Glu, глутатион S-трансферазу (GST), тиоредоксин, белок А, белок G, константную область (Fc) тяжелой цепи иммуноглобулина, мальтозусвязывающий белок (MBP) или сывороточный альбумин человека. С целью аффинной очистки используют подходящие матрицы для аффинной хроматографии, такие как смолы, конъюгированные с глутатионом, амилазой и никельем или кобальтом. Многие такие матрицы доступны в форме "наборов", таких как система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen), которые можно использовать с партнерами слияния (HIS₆). В качестве другого примера домен слияния можно выбирать с тем, чтобы облегчать обнаружение полипептидов ловушки для 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. Общеизвестные эпитопные метки, для которых специфические моноклональные антитела легко доступны, включают метки FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (HA) и с-мус. В некоторых случаях домены слияния имеют сайт расщепления протеазой, такой как для фактора Ха или тромбина, который позволяет подходящей протеазе частично расщеплять слитые белки и, тем самым, высвобождать из них рекомбинантные белки. Высвобожденные белки затем можно отделять от домена слияния посредством последующего хроматографического разделения.

В определенных вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB могут содержать одну или несколько модификаций, которые способны стабилизировать полипептиды. Например, такие модификации увеличивают время полужизни полипептидов *in vitro*, увеличивают время полужизни полипептидов в циркуляции и/или снижают протеолитическое разрушение полипептидов. Такие стабилизирующие модификации включают, но не ограничиваясь этим, слитые белки (включая, например, слитые белки, содержащие домен полипептида ALK4 и/или ActRIIB и домен-стабилизатор), модификации участка гликозилирования (включая, например, добавление участка гликозилирования в полипептид по раскрытию) и модификации молекулы углевода (включая, например, удаление молекул углеводов из полипептида по раскрытию). Как используют в настоящем описании, термин "домен-стабилизатор" не только относится к домену слияния (например, Fc-домену иммуноглобулина), как в случае слитых белков, но также включает небелковые модификации, такие как молекула углевода или небелковый фрагмент, такой как полиэтиленгликоль.

В предпочтительных вариантах осуществления гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, подлежащие использованию в соответствии со способами, описанными в настоящем описании, представляют собой вы-

деленные комплексы. Как используют в настоящем описании, выделенный белок (или белковый комплекс) или полипептид (или полипептидный комплекс) представляет собой тот, который отделен от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления гетеромультимер по раскрытию очищают до чистоты больше чем 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, как определяют, например, посредством электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрическое фокусирование (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматографии (например, ионообменная хроматография или ВЭЖХ с обращенной фазой). Способы оценки чистоты антитела хорошо известны в данной области [Flatman et al., (2007) *J. Chromatogr. B* 848:79-87]. В некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимера ALK4:ActRIIB по существу не содержат гомомультимеров ALK4 и/или ActRIIB. Например, в некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимера ALK4:ActRIIB содержат приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или меньше чем 1% гомомультимеров ALK4. В некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимера ALK4:ActRIIB содержат приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или меньше чем 1% гомомультимеров ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления препараты гетеромультимера ALK4:ActRIIB содержат приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или меньше чем 1% гомомультимеров ALK4 и приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или меньше чем 1% гомомультимеров ActRIIB.

В определенных вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB, а также гетеромультимеры, которые содержат их, по раскрытию можно получать различными способами, известными в данной области. Например, полипептиды можно синтезировать с использованием стандартных способов белковой химии, таких как те, которые описан в Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) и Grant G. A. (ред.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Кроме того, коммерчески доступны автоматизированные пептидные синтезаторы (Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Альтернативно, полипептиды, в том числе их фрагменты или варианты, можно получать рекомбинантным путем, используя различные экспрессирующие системы [*E. coli*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки COS, бакуловирус], как хорошо известно в данной области. В дополнительном варианте осуществления модифицированные или немодифицированные полипептиды можно получать посредством расщепления рекомбинантно получаемых полноразмерных полипептидов ALK4 и/или ActRIIB с использованием, например, протеазы, например, трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина, или фермента, превращающего спаренные основные аминокислоты (РАСЕ). Компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступного программного обеспечения, например, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) можно использовать для того, чтобы идентифицировать сайты протеолитического расщепления.

В. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ALK4 и/или ActRIIB.

В определенных вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает выделенные и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие рецепторы ALK4 и/или ActRIIB (включая их фрагменты, функциональные варианты и слитые белки), описанные в настоящем описании. Например, SEQ ID № 11 кодирует встречающийся в природе полипептид предшественника ALK4 человека, тогда как SEQ ID № 12 кодирует зрелый внеклеточный домен ALK4. 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 гетеромультимеров ALK4:ActRIIB, как раскрыто в настоящем описании.

Как используют в настоящем описании, выделенная нуклеиновая кислота(ы) относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые, как правило, содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в определенном местоположении в хромосоме, которое отличается от ее естественного местоположения в хромосоме.

В определенных вариантах осуществления понимают, что нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ALK4 и/или ActRIIB по настоящему раскрытию включают какую-либо одну из SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40 или 43, а также их вариантов. Нуклеотидные последовательности вариантов включают последовательности, которые отличаются одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делениями, включая аллельные варианты, и, следовательно, включают кодирующие последовательности, которые отличаются от нуклеотидной последовательности, приведенной в какой-либо одной из SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43.

В определенных вариантах осуществления полипептиды ALK4 и/или ActRIIB суперсемейства TGF- β по настоящему раскрытию кодируют выделенные или рекомбинантные последовательности нуклеиновой кислоты, которые содержат, состоят по существу из или состоят из 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 SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40 или 43. Специалист в данной области примет во внимание, что последовательности нуклеиновой кислоты, которые содержат, состоят по существу из или состоят из последовательности, комплементарной 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 SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40 или 43, также входят в объем настоящего раскрытия. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты по раскрытию можно выделять, рекомбинировать и/или сливать с гетерологичной нуклеотидной последовательностью или в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию также включают нуклеотидные последовательности, которые образуют гибриды при строгих условиях с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40 или 43, комплементарной последовательностью из SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40 или 43 или их фрагментами. Специалист в данной области легко поймет, что условия подходящей степени строгости, которые способствуют гибридизации ДНК, можно варьировать. Например, можно выполнять гибридизацию в $6,0\times$ хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) приблизительно при 45°C , после чего следует промывание в $2,0\times$ SSC при 50°C . Например, концентрацию соли на стадии промывания можно выбирать из степени строгости от низкой около $2,0\times$ SSC при 50°C до высокой около $0,2\times$ SSC при 50°C . Кроме того, температуру на стадии промывания можно повышать от условий низкой степени строгости при комнатной температуре, приблизительно 22°C , до условий высокой строгости приблизительно при 65°C . Как температуру, так и соль можно варьировать, или температуру или концентрацию соли можно сохранять постоянной, тогда как другую переменную изменяют. В одном из вариантов осуществления раскрытие предусматривает нуклеиновые кислоты, которые образуют гибриды при условиях низкой степени строгости $6\times$ SSC при комнатной температуре, после чего следует промывание в $2\times$ SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, как изложено в SEQ ID №№ 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40 или 43, в пределах вырожденности генетического кода, также входят в объем раскрытия. Например, многие аминокислоты обозначаются больше чем одним триплетом. Кодоны, которые определяют одну и ту же аминокислоту, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами для гистидина) могут вести к "молчащим" мутациям, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако ожидают, что полиморфизмы последовательности ДНК, которые ведут к изменениям аминокислотных последовательностей рассматриваемых белков, будут существовать среди клеток млекопитающих. Специалист в данной области примет во внимание, что эти вариации в одном или нескольких нуклеотидах (приблизительно до 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать среди индивидуальных представителей данного биологического вида из-за естественной вариации аллелей. Какие-либо и все такие вариации нуклеотидов и получаемые аминокислотные полиморфизмы входят в объем этого раскрытия.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по раскрытию могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности в целом должны подходить для клетки-хозяина, используемой для экспрессии. Подходящие экспрессирующие векторы и подходящие регуляторные последовательности многих типов известны в данной области для различных клеток-хозяев. Обычно указанная одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей может содержать, но не ограничиваясь этим, последовательности промоторов, лидерные или сигнальные последовательности, участки связывания рибосомы, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и последовательности энхансеров или активаторов. Раскрытием предусмотрены конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в данной области. Промоторы могут представлять собой или встречающиеся в природе промоторы или гибридные промоторы, которые объединяют элементы больше чем одного промотора. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плазмиды, или экспрессионную конструкцию можно вставлять в хромосому. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор содержит ген селективного маркера для того, чтобы сделать возможным отбор трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в данной области и варьируют в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В определенных аспектах, рассматриваемую нуклеиновую кислоту предоставляют в экспрессирующем векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ALK4 и/или ActRIIB и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности приняты в данной области, и их выбирают для управления экспрессией полипептида ALK4 и/или ActRIIB.

Соответственно, термин регуляторная последовательность включает промоторы, энхансеры и другие управляющие экспрессией элементы. Образцовые регуляторные последовательности описаны в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, любую из широкого спектра управляющих экспрессией последовательностей, которые управляют экспрессией последовательности ДНК, когда функционально связаны с ней, можно использовать в этих векторах для того, чтобы экспрессировать последовательности ДНК, кодирующие полипептиды ALK4 и/или ActRIIB. Такие подходящие управляющие экспрессией последовательности включают, например, ранние и поздние промоторы SV40, промотор tet, предранний промотор аденовирусов или цито-

мегаловирусов, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессией которого управляет РНК полимеразы T7, основные операторные и промоторные участки фага лямбда, управляющие участки для белка оболочки fd, промотор для 3-фосфолицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5, промоторы факторов спаривания а дрожжей, полиэдральный промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, которые, как известно, управляют экспрессией генов прокариотических или эукариотических клеток, или их вирусы и различные их сочетания. Следует понимать, что конструкция экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и/или тип белка, который хотят экспрессировать. Кроме того, число копий вектора, способность управлять этим числом копий и экспрессией какого-либо другого белка, кодируемого вектором, такого как антибиотические маркеры, также следует принимать во внимание.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию можно получать посредством лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих) или тех и других. Экспрессионные носители для получения рекомбинантных полипептидов ALK4 и/или ActRIIB включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: плазмиды, полученные из pBR322, плазмиды, полученные из pEMBL, плазмиды, полученные из pEX, плазмиды, полученные из pVTac, и плазмиды, полученные из pUC, для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые экспрессирующие векторы млекопитающих содержат как прокариотические последовательности для того, чтобы содействовать размножению вектора в бактериях, так и одну или несколько эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Векторы, полученные из pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2 rpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pYug, представляют собой примеры экспрессирующих векторов млекопитающих, подходящие для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицируют последовательностями из бактериальных плазмид, таких как pBR322, чтобы содействовать репликации и отбору по устойчивости к лекарственному средству как в прокариотических, так и в эукариотических клетках.

Альтернативно, производные вирусов, такие как вирус папилломы коров (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барр (pHEBo, полученный из pREP и p205) можно использовать для временной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных (в том числе ретровирусных) экспрессирующих систем можно найти далее в описании систем доставки генной терапии. Различные способы, используемые при получении плазмид и трансформации организмов-хозяев, хорошо известны в данной области. Другие подходящие экспрессирующие системы как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также общие процедуры рекомбинации [Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3-е изд., ред. Sambrook, Fritsch and Maniatis Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001]. В некоторых случаях, может быть желательно экспрессировать рекомбинантные полипептиды посредством бакуловирусной экспрессирующей системы. Пример таких бакуловирусных экспрессирующих систем включают векторы, полученные из pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы, полученные из pAcUW (такие как pAcUW1), и векторы, полученные из pBlueBac (такие как pBlueBac III, содержащий β -галактозидазу).

В предпочтительном варианте осуществления вектор конструируют для получения рассматриваемых полипептидов ALK4 и/или ActRIIB в клетках CHO, например, вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Очевидно, что рассматриваемые генные конструкции можно использовать для того, чтобы вызывать экспрессию рассматриваемого полипептида ALK4 и/или ActRIIB в клетках, размножаемых в культуре, например, чтобы получать белки, в том числе слитые белки или белки вариантов, для очистки.

Это раскрытие также относится к клетке-хозяину, трансфицированной рекомбинантным геном, содержащим кодирующую последовательность для одного или нескольких из рассматриваемых полипептидов ALK4 и/или ActRIIB. Клетка-хозяин может представлять собой какую-либо прокариотическую или эукариотическую клетку. Например, полипептид ALK4 и/или ActRIIB можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомого (например, с использованием бакуловирусной экспрессирующей системы), дрожжах или клетках млекопитающих [например, клеточной линии яичника китайского хомяка (CHO)]. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Соответственно, настоящее раскрытие дополнительно относится к способам получения рассматриваемых полипептидов ALK4 и/или ActRIIB. Например, клетку-хозяина, трансфицированную экспрессирующим вектором, кодирующим полипептид ALK4 и/или ActRIIB, можно культивировать в подходящих условиях для того, чтобы сделать возможным протекание экспрессии полипептида ALK4 и/или ActRIIB. Полипептид может быть секретированным и выделенным из смеси клеток и среды, содержащей полипептид. Альтернативно, полипептид ALK4 и/или ActRIIB можно выделять из цитоплазматической или мембранной фракции, получаемой из собранных и лизированных клеток. Клеточная культура содержит клетки-хозяева, среды и другие побочные продукты. Подходящие среды для клеточной культуры хорошо

известны в данной области. Рассматриваемые полипептиды можно выделять из среды клеточной культуры, клеток-хозяев или того и другого, с применением известных в данной области способов очистки белков, включая ионообменную хроматографию, гельфильтрационную хроматографию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с использованием антител со специфичностью к конкретным эпитопам полипептидов ALK4 и/или ActRIIB и аффинную очистку с использованием средства, которое связывается с доменом, слитым с полипептидом ALK4 и/или ActRIIB (например, колонку с белком А можно использовать для того, чтобы очищать слитые белки ALK4-FC и/или ActRIIB-FC). В некоторых вариантах осуществления полипептид ALK4 и/или ActRIIB представляет собой слитый белок, содержащий, домен, который облегчает его очистку.

В некоторых вариантах осуществления очистки достигают посредством ряда стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или больше из следующего, в любом порядке: хроматография на белке А, хроматография на сефарозе Q, хроматография на фенилсефарозе, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать вирусным фильтрованием и заменой буфера. Полипептиды ALK4 и/или ActRIIB, а также их слитые белки, можно очищать до чистоты >90%, >95%, >96%, >98% или >99%, как определяют посредством эксклюзионной хроматографии, и >90%, >95%, >96%, >98% или >99%, как определяют посредством SDS PAGE. Целевой уровень чистоты должен быть таким, которого достаточно для достижения желательного результата в млекопитающих системах, в частности, у не являющихся человеком приматов, грызунов (мышей) и человека.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, такую как последовательность поли-(His)/сайта расщепления энтерокиназы на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида ALK4 и/или ActRIIB, может допускать очистку экспрессированного слитого белка посредством аффинной хроматографии с использованием смолы, содержащей металл Ni^{2+} . Тогда лидерную последовательность для очистки можно впоследствии удалять посредством обработки энтерокиназой, чтобы предоставлять очищенный полипептид ALK4 и/или ActRIIB, а также его гетеромультимеры [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, соединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, осуществляют в соответствии с общепринятыми способами, используя тупые или выступающие концы для лигирования, расщепление рестрикционными ферментами, чтобы предоставлять подходящие концы, заполнение липких концов, зависимости от ситуации, обработку щелочной фосфатазой для того, чтобы избежать нежелательного соединения и ферментативное лигирование. В другом варианте осуществления слитый ген можно синтезировать общепринятыми способами, включая автоматизированные синтезаторы ДНК. Альтернативно, ПЦР амплификацию фрагментов генов можно осуществлять с использованием якорных праймеров, которые дают начало комплементарным тупым концам между двумя последовательными фрагментами генов, которые можно впоследствии ренатурировать для того, чтобы создавать последовательность химерного гена. См., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, ред. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992.

С. Антительные антагонисты.

В определенных аспектах антагонистом ALK4:ActRIIB является антитело (антитело антагониста ALK4:ActRIIB) или комбинацию антител. Антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител может связываться, например, с одним или несколькими лигандами ALK4, лигандами ActRIIB, ALK4:ActRIIB-связывающими лигандами, рецептором ALK4, рецептором ActRIIB и/или одним или несколькими корецепторами суперсемейства TGF- β . Как раскрыто в настоящем описании, антитела антагонистов ALK4:ActRIIB можно использовать отдельно или в комбинации с одной или несколькими поддерживающими терапиями или активными средствами для лечения нуждающегося в этом (например, субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с костями, заболеванием или состоянием, связанным с мышцами, или заболеванием или состоянием, связанным с избыточным или нежелательным жиром).

В определенных аспектах, антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует одно или несколько из лигандов, связанных или вероятно связанных гетеромультимером ALK4:ActRIIB, таких как активин В, GDF11, активин А, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с одним из таких лигандов. Например, как используют в настоящем описании, антитело к активину В (или антитело против активина В) в целом относится к антителу, которое может связываться с активином В с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на активин В. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к активину В с не родственным белком не активина В составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с активином В, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), *Biacore*, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления

антитело к активину В связывается с эпитопом активина В, который консервативен среди активина В от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против активина В связывается с активинном В человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину В может ингибировать связывание активина В с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и, таким образом, ингибировать опосредованную активинном В передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к активину В может ингибировать связывание активина В с корецептором и, таким образом, ингибировать опосредованную активинном В передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD).

Следует отметить, что активин В обладает некоторой гомологией последовательности с активинном А, С и Е и, следовательно, антитела, которые связываются с активинном В, в некоторых случаях, также могут связываться с другим активинном и/или ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается, например, с активинном В и дополнительно связывается, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с активинном В, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D больше 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованию, где комбинация антител содержит комбинацию антител, которые связываются, например, с двумя или больше лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител не содержит антитело к BMP9.

В определенных аспектах, антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере GDF8. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с GDF8. Как используют в настоящем описании, антитело к GDF8 (или антитело против GDF8) в целом относится к антителу, которое связывается с GDF8 с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на GDF8. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к GDF8 с не родственным белком не GDF8 составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с GDF8, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), Biacore, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело к GDF8 связывается с эпитопом GDF8, который консервативен среди GDF8 от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против GDF8 связывается с GDF8 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к GDF8 может ингибировать связывание GDF8 с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и, таким образом, ингибировать GDF8-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к GDF8 может ингибировать связывание GDF8 с корецептором и, таким образом, ингибировать GDF8-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). Следует отметить, что GDF8 обладает высокой гомологией последовательности с GDF11, и, следовательно, антитела, которые связываются с GDF8, в некоторых случаях, также могут связываться с GDF11 и/или ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается с GDF8 и дополнительно связывается, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, BMP10, BMP6 и GDF3], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с GDF8, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D больше чем 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело к GDF8 и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF3,

BMP6 и BMP10], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител, которая содержит антитело к GDF8, не содержит антитело к BMP9.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере GDF11. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с GDF11. Как используют в настоящем описании, антитело к GDF11 (или антитело против GDF11) в целом относится к антителу, которое связывается с GDF11 с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на GDF11. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к GDF11 с не родственным белком не GDF11 составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с GDF11, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), Вiasoge, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело к GDF11 связывается с эпитопом GDF11, который консервативен среди GDF11 от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против GDF11 связывается с GDF11 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к GDF11 может ингибировать связывание GDF11 с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и, таким образом, ингибировать GDF11-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к GDF11 может ингибировать связывание GDF11 с корецептором и, таким образом, ингибировать GDF11-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). Следует отметить, что GDF11 обладает высокой гомологией последовательности с GDF8, и, следовательно, антитела, которые связываются с GDF11, в некоторых случаях, также могут связываться с GDF8 и/или ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается с GDF11 и дополнительно связывается, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с GDF11, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D больше чем 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело к GDF11 и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF3, BMP6 и BMP10], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител, которая содержит антитело к GDF11, не содержит антитело к BMP9.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере GDF3. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с GDF3. Как используют в настоящем описании, антитело к GDF3 (или антитело против GDF3) в целом относится к антителу, которое связывается с GDF3 с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на GDF3. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к GDF3 с не родственным белком не GDF3 составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с GDF3, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), Вiasoge, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело к GDF3 связывается с эпитопом GDF3, который консервативен среди GDF3 от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против GDF3 связывается с GDF3 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к GDF3 может ингибировать связывание GDF3 с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и, таким образом, ингибировать GDF3-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к GDF3 может ингибировать связывание GDF3 с корецептором и, таким образом, ингибировать GDF3-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается с GDF3 и дополнительно связывается,

например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, BMP10, BMP6 и GDF11], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с GDF3, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D больше чем 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело к GDF3 и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF11, BMP6 и BMP10], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител, которая содержит антитело к GDF3, не содержит антитело к BMP9.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере BMP6. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с BMP6. Как используют в настоящем описании, антитело к BMP6 (или антитело против BMP6) в целом относится к антителу, которое связывается с BMP6 с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на BMP6. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к BMP6 с не родственным белком не BMP6 составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с BMP6, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), *Biacore*, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело к BMP6 связывается с эпитопом BMP6, который консервативен среди BMP6 от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против BMP6 связывается с BMP6 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к BMP6 может ингибировать связывание BMP6 с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и, таким образом, ингибировать BMP6-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к BMP6 может ингибировать связывание BMP6 с корецептором и, таким образом, ингибировать BMP6-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается с BMP6 и дополнительно связывается, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, BMP10, GDF3 и GDF11], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с BMP6, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D больше чем 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело к BMP6 и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF11, GDF3 и BMP10], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител, которая содержит антитело к BMP6, не содержит антитело к BMP9.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере BMP10. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с BMP10. Как используют в настоящем описании, антитело к BMP10 (или антитело против BMP10) в целом относится к антителу, которое связывается с BMP10 с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на BMP10. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к BMP10 с не родственным белком не BMP10 составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с BMP10, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), *Biacore*, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело к

ВМР10 связывается с эпитопом ВМР10, который консервативен среди ВМР10 от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против ВМР10 связывается с ВМР10 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВМР10 может ингибировать связывание ВМР10 с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и, таким образом, ингибировать ВМР10-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к ВМР10 может ингибировать связывание ВМР10 с корецептором и, таким образом, ингибировать ВМР10-опосредованную передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается с ВМР10 и дополнительно связывается, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, BMP6, GDF3 и GDF11], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с ВМР10, не связывается или по существу не связывается с ВМР9 (например, связывается с ВМР9 с K_D больше чем 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело к ВМР10 и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF11, GDF3 и BMP6], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител, которая содержит антитело к ВМР10, не содержит антитело к ВМР9.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере активин (активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС и/или активин ВЕ). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с активином (активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином АЕ, активином ВС и/или активином ВЕ). Как используют в настоящем описании, антитело к активину (или антитело против активина) в целом относится к антителу, которое может связываться с определенной формой активина с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на эту форму активина. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела к активину с не родственным белком не активина составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с активином, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), Вiasore, или другого анализа взаимодействия белков или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело к активину связывается с эпитопом активина, который консервативен среди активинов от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против активина связывается с активином человека. В других предпочтительных вариантах осуществления, антитело к активину может ингибировать связывание активина с рецептором I типа и/или II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и таким образом, ингибировать, опосредованную активином передачу сигнала (например, передачу сигнала SMAD). В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином В. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином А. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином А и активином В. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином АВ. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином С. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином Е. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином А и активином С. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином АС. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином А и активином Е. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином АЕ. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином В и активином С. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином ВС. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином В и активином Е. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином ВЕ. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином А, активином В и активином С. В некоторых вариантах осуществления антитело к активину связывается с активином А, активином В и активином Е. Необязательно, антитело к активину, которое связывается с одним или несколькими из активина А, активина В и активина С, дополнительно может связываться с активином Е. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к полиспецифическому анти-

телу (например, биспецифическому антителу) и его использованиям, которое связывается с активином и дополнительно связывается, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [например, GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело, которое связывается с активином, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D больше чем 1×10^{-7} М или имеет относительно умеренное связывание, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело к активину и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими дополнительными лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [например, GDF11, GDF8 GDF3, BMP6 и BMP10], одним или несколькими рецепторами I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB и/или ALK4) и/или одним или несколькими корецепторами. В некоторых вариантах осуществления комбинация антител, которая содержит антитело к активину, не содержит антитело к BMP9.

В отношении антител, которые связываются с и антагонизируют лиганды, которые связываются с ALK4:ActRIIB, [например, активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF3, BMP6, GDF11 и BMP10], предусмотрено, что антитело можно разрабатывать как биспецифическое антитело, содержащее первую часть, которая связывается с эпитопом такого лиганда так, что первая часть конкурирует за связывание с рецептором I типа, и содержащее вторую часть, которая связывается с эпитопом такого лиганда так, что вторая часть антитела конкурирует за связывание с рецептором II типа. Таким образом, биспецифическое антитело, направленное на один лиганд можно разрабатывать для того, чтобы имитировать двойное блокирующее связывание рецептором I типа-II типа, которое может давать гетеромультимер ALK4:ActRIIB. Аналогичным образом предусмотрено, что того же эффекта можно достигать с использованием комбинации двух или больше антител, в которой по меньшей мере первое антитело связывается с эпитопом такого лиганда так, что первое антитело конкурирует за связывание с рецептором I типа, и по меньшей мере второе антитело связывается с эпитопом такого лиганда так, что второе антитело конкурирует за связывание с рецептором II типа.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере ActRIIB. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с ActRIIB. Как используют в настоящем описании, антитело к ActRIIB (антитело против ActRIIB) в целом относится к антителу, которое связывается с ActRIIB с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на ActRIIB. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела против ActRIIB с не родственным белком не ActRIIB составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с ActRIIB, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), Вiasoge, или другого анализа белок-белкового взаимодействия или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело против ActRIIB связывается с эпитопом ActRIIB, который консервативен среди ActRIIB от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против ActRIIB связывается с ActRIIB человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против ActRIIB может ингибировать связывание одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB [такими как GDF8, активин (например, активин А, активин В и активин АВ) GDF3, BMP6 и BMP10], с ActRIIB и/или ALK4. В некоторых вариантах осуществления антитело против ActRIIB представляет полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело), которое связывается с ActRIIB и одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB [такими как GDF11, GDF8, активин (например, активин А, активин В, и активин АВ) GDF3, BMP6 и BMP10], рецептором I типа (например, ALK4), корецептором и/или дополнительным рецептором II типа. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело против ActRIIB и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB [такими как GDF11, GDF8, активин (например, активин А, активин В и активин АВ) GDF3, BMP6, BMP10, NODAL и BMP9], корецепторами, рецепторами I типа (например, ALK4) и/или дополнительными рецепторами II типа. Следует отметить, что ActRIIB обладает сходством последовательности с ActRIIA и, следовательно, антитела, которые связываются с ActRIIB, в некоторых случаях, также могут связываться с ActRIIA и/или ингибировать его.

В определенных аспектах антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере ALK4. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело антагониста ALK4:ActRIIB или комбинация антител связывается по мень-

шей мере с ALK4. Как используют в настоящем описании, антитело к ALK4 (антитело против ALK4) в целом относится к антителу, которое связывается с ALK4 с достаточной аффинностью так, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на ALK4. В определенных вариантах осуществления степень связывания антитела против ALK4 с не родственным белком не ALK4 составляет приблизительно меньше чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или приблизительно меньше чем 1% от связывания антитела с ALK4, как измеряют, например, посредством радиоиммунного анализа (RIA), *Biacore*, или другого анализа белок-белкового взаимодействия или аффинности связывания. В определенных вариантах осуществления антитело против ALK4 связывается с эпитопом ALK4, который консервативен среди ALK4 от различных биологических видов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело против ALK4 связывается с ALK4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против ALK4 может ингибировать связывание одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB [таких как GDF11, GDF8, активин (например, активин А, активин В и активин АВ) GDF3, BMP6 и BMP10], с рецептором I типа (например, ALK4), рецептором II типа (например, ActRIIB) или корецептором. В некоторых вариантах осуществления антитело против ALK4 представляет полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело), которое связывается с ALK4 и одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], рецепторами II типа (например, ActRIIB), корецепторами и/или дополнительным рецептором I типа. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к комбинациям антител и их использованиям, где комбинация антител содержит антитело против ALK4 и одно или несколько дополнительных антител, которые связываются, например, с одним или несколькими лигандами суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB [такими как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], корецепторами, дополнительным рецептором I типа и/или рецепторами II типа (например, ActRIIB).

Как раскрыто в настоящем описании, существуют различные способы создания гетеромультимеров. Такие способы можно использовать для того, чтобы создавать гетеромультимеры, которые содержат антителосвязывающий домен (например, комплекс цепей V_L и V_H) и один или несколько полипептидов, выбранных из полипептида ALK4, полипептида ActRIIB, гетеромера ALK4:ActRIIB или одного полипептида ALK4:ActRIIB с ловушкой. См. фиг. 10 и 12D. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает белковые комплексы, содержащие лигандсвязывающий домен антитела, который связывается с ALK4:ActRIIB-связывающим лигандом [таким как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], который ковалентно или нековалентно связан с полипептидом ALK4. В некоторых вариантах осуществления раскрытие предусматривает белковые комплексы, содержащие лигандсвязывающий домен антитела, который связывается с ALK4:ActRIIB-связывающим лигандом [таким как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], который ковалентно или нековалентно связан с полипептидом ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает белковые комплексы, содержащие лигандсвязывающий домен антитела, который связывается с ALK4:ActRIIB-связывающим лигандом [таким как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], который ковалентно или нековалентно связан с одноцепочечной ловушкой для лигандов ALK4:ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает белковые комплексы, содержащие лигандсвязывающий домен антитела, который связывается с ALK4:ActRIIB-связывающим лигандом, ковалентно или нековалентно связанным с гетеромультимером ALK4:ActRIIB.

Термин антитело используют в настоящем описании в самом широком смысле, и он охватывает различные структуры антител, включая в качестве неограничивающих примеров моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желательную антигенсвязывающую активность. Фрагмент антитела относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваясь этим, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и полиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител [см., например, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; Plückthun, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, том 113, ред. Rosenburg и Moore, (Springer-Verlag, New York), стр. 269-315 (1994); WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894; 5587458; и 5869046]. Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя участками связывания антигена, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими [см., например, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); и Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448]. Триатела и тетраатела также описаны в Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие целиком или частично вариабельный домен тяжелой

цепи или целиком или частично вариабельный домен легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека [см., например, патент США № 6248516]. Антитела, описанные в настоящем описании, могут представлять собой поликлональные антитела или моноклональные антитела. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему раскрытию содержат метку, прикрепленную к ним и поддающуюся обнаружению (например, метка может представлять собой радиоизотоп, флуоресцирующее соединение, фермент или кофактор фермента). В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитела по настоящему раскрытию представляют собой выделенные антитела. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитела по настоящему раскрытию представляют собой рекомбинантные антитела.

Антитела в настоящем описании могут относиться к любому классу. Класс антитела относится к типу константного домена или константной области, принадлежащей его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют α , δ , ϵ , γ и μ .

В целом, антитела для использования в способах, описанных в настоящем описании, специфически связываются со своим целевым антигеном, предпочтительно с высокой аффинностью связывания. Аффинность можно выражать в виде значения K_D , которое отражает истинную аффинность связывания (например, с минимизированными эффектами avidности). Обычно аффинность связывания измеряют *in vitro*, в бесклеточной среде или среде, ассоциированной с клетками. Любые из множества анализов, известных в данной области, включая те, которые описаны в настоящем описании, можно использовать для получения измерений аффинности связывания, включая, например, *Biacore*, антигенсвязывающий анализ с радиоактивной меткой (RIA) и ELISA. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему раскрытию связываются с их целевыми антигенами (такими как ALK4, ActRIIB, активин А, активин В, активин АВ, GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3) по меньшей мере с K_D 1×10^{-7} или прочнее, 1×10^{-8} или прочнее, 1×10^{-9} или прочнее, 1×10^{-10} или прочнее, 1×10^{-11} или прочнее, 1×10^{-12} или прочнее, 1×10^{-13} или прочнее или 1×10^{-14} или прочнее.

В определенных вариантах осуществления K_D измеряют посредством RIA, выполняемого с использованием Fab-версии антитела, представляющего интерес, и его целевого антигена, как описано в следующем анализе. Аффинность связывания Fab в растворе с антигеном измеряют посредством уравнивания Fab с минимальной концентрацией радиоактивно меченного антигена (например, меченного ¹²⁵I) в присутствии серии титров немеченого антигена, с последующим захватом связанного антигена с использованием планшета, покрытого антителом против Fab [см., например, Chen et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. Чтобы установить условия для анализа, многолуночные планшеты (например, MICROTITER® из Thermo Scientific) покрывают (например, в течение ночи) иммобилизованным антителом против Fab (например, из Cappel Labs) и впоследствии блокируют бычьим сывороточным альбумином, предпочтительно при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующем планшете радиоактивно меченный антиген смешивают с серийными разведениями Fab, представляющего интерес, [например, в соответствии с оценкой антитела против VEGF, Fab-12, в Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]. Fab, представляющий интерес, затем инкубируют, предпочтительно в течение ночи, но инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, приблизительно 65 часов), чтобы гарантировать, что равновесие достигнуто. После этого, смеси переносят в иммобилизованный планшет для инкубации, предпочтительно при комнатной температуре, приблизительно на один час. Затем раствор удаляют и планшет промывают несколько раз, предпочтительно смесью полисорбата 20 и PBS. Когда планшеты высыхают, добавляют сцинтиллятор (например, MICROSCINT® из Packard) и производят подсчет в планшетах на гамма-счетчике (например, TOPCOUNT® из Packard).

В соответствии с другим вариантом осуществления, K_D измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса, используя, например, а BIACORE® 2000 или BIACORE® 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, N.J.) с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном приблизительно при 10 единицах ответа (RU). В кратком изложении, биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIACORE, Inc.) активируют гидрхлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Например, антиген можно разводить в 10 mM ацетате натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (приблизительно 0,2 мкМ) перед инъекцией при скорости потока 5 мкл/минута, чтобы достигать приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена, 1 M этаноламин инъецируют, чтобы блокировать непрореагировавшие группы. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% поверхностно-активного средства полисорбат 20 (TWEEN-20®) (PBST) при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием, например, простой модели связывания Ленгмюра "один к одному" (BIACORE® Evaluation Software версии 3.2) посредством одновременной аппроксимации сенсограммы ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_D) вы-

числяют как соотношение k_{off}/k_{on} [см., например, Chen et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. Если скорость ассоциации превышает, например, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ в приведенном выше анализе поверхностного плазмонного резонанса, то скорость ассоциации можно определять с использованием способа гашения флуоресценции, в котором измеряют увеличение или уменьшение интенсивности испускания флуоресценции (например, возбуждение=295 нм; испускание=340 нм, полоса пропускания 16 нм) 20 нМ антитела к антигену (Fab-форма) в PBS в присутствии увеличивающейся концентрации антигена, как измеряют в спектрометре, таком как спектрофотометр с остановкой потока (Aviv Instruments) или спектрофотометр SLM-AMINCO® серии 8000 (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

Фрагменты антител можно получать различными способами, включая в качестве неограничивающих примеров протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получение с помощью рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фaг), как раскрыто в настоящем описании. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот для GDF11, активина А, активина В, активина С, активина Е, GDF8, BMP6, ActRIIB, ALK4, GDF3 и BMP9 человека хорошо известны в данной области. Кроме того, многие способы создания антител хорошо известны в данной области, некоторые из которых описаны в настоящем описании. Следовательно, антительные антагонисты для использования в соответствии с этим раскрытием может обычным образом получать специалист в данной области на основании знаний в данной области и положений, предоставленных в настоящем описании.

В определенных вариантах осуществления антитело, предоставленное в настоящем описании, представляет собой химерное антитело. Химерное антитело относится к антителу, для которого часть тяжелой и/или легкой цепи извлекают из конкретного источника или биологического вида, тогда как остальную часть тяжелой и/или легкой цепи извлекают из другого источника или биологического вида. Определенные химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567; и Morrison et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит не относящуюся к человеку вариabельную область (например, вариabельную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, не являющегося человеком, такого как обезьяна) и константную область человека. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело представляет собой антитело "с переключенным классом", у которого изменен класс или подкласс относительного такового у исходного антитела. В целом химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В определенных вариантах осуществления химерное антитело, предоставленное в настоящем описании, представляет собой гуманизованное антитело. Гуманизованное антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из относящихся к человеку гипервариabельных областей (HVR) и аминокислотные остатки из каркасных областей (FR) человека. В определенных вариантах осуществления гуманизованное антитело содержит, по существу, целый по меньшей мере один и обычно два вариabельных домена, где целые или по существу целые HVR (например, CDR) соответствуют таковым из не принадлежащего человеку антитела, а целые или по существу целые FR соответствуют таковым из антитела человека. Гуманизованное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека. "Гуманизованная форма" антитела, например, не принадлежащего человеку антитела, относится к антителу, которая подверглась гуманизации. Гуманизованные антитела и способы их получения рассмотрены, например, в Almagro and Fransson (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633 и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al., (1988) *Nature* 332:323-329; Queen et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; патентах США №№ 5821337; 7527791; 6982321; и 7087409; Kashmiri et al., (2005) *Methods* 36:25-34 [описание пересадки SDR (a-CDR)]; Padlan, *Mol. Immunol.* (1991) 28:489-498 (описание "изменения поверхности"); Dall'Acqua et al. (2005) *Methods* 36:43-60 (описание "перетасовки FR"); Osbourn et al. (2005) *Methods* 36:61-68; и Klimka et al. *Br. J. Cancer* (2000) 83:252-260 (описание подхода "направляемого отбора" для перетасовки FR). Каркасные области человека, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваясь этим: каркасные области, выбранные с использованием способа "наилучшего соответствия" [см., например, Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296]; каркасные области, полученные из консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы вариabельных областей легких или тяжелых цепей [см., например, Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; и Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623]; зрелые (соматически мутировавшие) каркасные области человека или каркасные области зародышевой линии человека [см., например, Almagro and Fransson (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633]; и каркасные области, полученные при скрининге библиотек FR [см., например, Vasa et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; и Rosok et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618].

В определенных вариантах осуществления антитело, предусмотренное в настоящем описании, представляет собой антитело человека. Антитела человека можно получать с использованием различных способов, известных в данной области. Антитела человека описаны в целом в van Dijk and van de Winkel (2008) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459. Например, антитела человека можно получать посредством введения иммуногена (например, полипептида GDF11, полипептида активина В, полипептида ActRIIA или полипептида ActRIIB) трансгенному животному, которое модифицировали для того, чтобы продуцировать интактные антитела человека или интактные

антитела с переменными областями человека в ответ на антигенный стимул. Такие животные обычно содержат целиком или частично локусы иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов или которые присутствуют внехромосомно или встроены в хромосомы животного случайным образом. У таких трансгенных животных эндогенные локусы иммуноглобулинов в целом инактивированы. Обзор способов получения антител человека от трансгенных животных см., например, в Lonberg (2005) *Nat. Biotech.* 23:1117-1125; патентах США №№ 6075181 и 6150584 (описание технологии XENOMOUSE™); патенте США № 5770429 (описание технологии HuMab®); патенте США № 7041870 (описание технологии K-M MOUSE®); и публикации патентной заявки США № 2007/0061900 (описание технологии VelociMouse®). Варибельные области человека из интактных антител, создаваемых с помощью таких животных, дополнительно можно модифицировать, например, посредством комбинирования с другой константной областью человека.

Антитела человека, предусмотренные в настоящем описании, также можно получать посредством гибридомных способов. Описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения моноклональных антител человека [см., например, Kozbor *J. Immunol.*, (1984) 133: 3001; Brodeur et al. (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, стр. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; и Boerner et al. (1991) *J. Immunol.*, 147: 86]. Антитела человека, создаваемые посредством технологии гибридом В-клеток человека, также описаны в Li et al., (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562. Дополнительные способы включают те, которые описаны, например, в патенте США № 7189826 (описание получения моноклональных антител IgM человека из гибридомных клеточных линий) и Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26(4):265-268 (2006) (описание гибридом типа "человек-человек"). Технология гибридом человека (технология Trioma) также описана в Vollmers and Brandlein (2005) *Histol. Histopathol.*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein (2005) *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27 (3):185-91. Антитела человека, предусмотренные в настоящем описании, также можно создавать посредством выделения последовательностей варибельного домена клона Fv, выбранные из библиотек фагового дисплея, полученных от человека. Такие последовательности варибельных доменов затем можно комбинировать с желаемым константным доменом человека. Способы выбора антитела человека из библиотек антител известны в данной области и описаны в настоящем описании.

Например, антитела по настоящему раскрытию можно выделять посредством скрининга комбинаторных библиотек на антитела с желаемой активностью или активностями. Различные способы известны в данной области для создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие желаемыми характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, у Hoogenboom et al. (2001) в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ред., Human Press, Totowa, N.J. и дополнительно описаны, например, в McCafferty et al. (1991) *Nature* 348:552-554; Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks and Bradbury (2003) в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ред., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310; Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093; Fellouse (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472; и Lee et al. (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132.

В определенных способах фагового дисплея репертуары генов V_H и V_L клонируют отдельно посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинируют в фаговые библиотеки, которые затем подвергаются скринингу на антигенсвязывающий фаг, как описано в Winter et al. (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455. Фаг обычно представляет фрагменты антител, или в виде фрагментов одноцепочечных Fv (scFv) или в виде Fab-фрагментов. Библиотеки от иммунизированных источников предоставляют антитела с высокой аффинностью к иммуногену (например, GDF11, активину B, ALK4 или ActRIIB) без необходимости конструировать гибридомы. Альтернативно, нативный репертуар можно клонировать (например, от человека), чтобы предоставлять один источник антител к широкому диапазону не собственных, а также собственных антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al. (1993) *EMBO J*, 12: 725-734. Наконец, наивные библиотеки также можно создавать синтетически посредством клонирования не перестроенных сегментов V-генов из стволовых клеток и используя ПЦР праймеры, содержащие случайную последовательность для того, чтобы кодировать высоко варибельные участки CDR3 и выполнять перестройку *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388. Публикации патентов, описывающие фаговые библиотеки антител человека включают, например: патент США № 5750373 и публикации патентов США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/011712 6, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

В определенных вариантах осуществления антитело, предусмотренное в настоящем описании, представляет собой полиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Полиспецифические антитела (обычно моноклональные антитела), которые обладают специфичностями связывания по меньшей мере с двумя различными эпитопами (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью или больше) на одном или нескольких (например, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше) антигенах.

Способы получения полиспецифических антител включают, но не ограничиваясь этим, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелой цепи/легкой цепи иммуноглобулина, обладающих

различными специфичностями [см., например, Milstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537; публикацию международного патента № WO 93/08829; и Traunecker et al. (1991) *EMBO J.* 10: 3655, и патент США № 5731168 (конструирование "выступа-во-впадине")].

Полиспецифические антитела также можно получать посредством конструирования эффектов электростатического управления, чтобы получать гетеродимерные молекулы Fc антитела (см., например, WO 2009/089004A1); сшивки двух или больше антител или фрагментов [см., например, патент США № 4676980; и Brennan et al. (1985) *Science*, 229: 81]; использования лейциновых молнии для того, чтобы получать биспецифические антитела [см., например, Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553]; использования технологии "диател" для получения фрагментов биспецифических антител [см., например, Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448]; использования димеров одноцепочечных Fv (sFv) [см., например, Gruber et al. (1994) *J. Immunol.*, 152:5368]; и получения триспецифических антител (см., например, Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147: 60. Полиспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител. Сконструированные антитела с тремя или больше функциональными участками связывания антигена, включая "антитела Octopus", также включены в настоящее описание [см., например, US 2006/0025576A1].

В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой моноклональное антитело. Моноклональное антитело относится к антителу, получаемому из популяции по существу гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связывают один и эпитоп, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающие во время получения препарата моноклонального антитела, такие варианты в целом присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела, направленные против различных эпитопов, каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против единственного эпитопа на антигене. Таким образом, модификатор "моноклональный" указывает на характер антитела в качестве получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать в качестве требования получать антитело каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие использованию в соответствии с данными способами, можно создавать с помощью различных способов, включая в качестве неограничивающих примеров гибридомный способ, способы рекомбинантной ДНК, способы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, содержащих целиком или частично локусы иммуноглобулинов человека, такие способы и другие образцовые способы получения моноклональных антител описаны в настоящем описании.

Например, используя иммуногены, полученные из GDF11, антисыворотки или моноклональные антитела против белка/против пептида можно получать по стандартным протоколам [см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, под ред. Harlow и Lane (1988) Cold Spring Harbor Press: 1988]. Млекопитающее, такое как мышь, хомяк или кролик, можно иммунизировать иммуногенной формой полипептида GDF11, антигенным фрагментом, который способен вызывать образование антител, или слитым белком. Способы придания иммуногенности белку или пептиду включают конъюгацию с носителями или другие способы, хорошо известные в данной области. Иммуногенную часть полипептида GDF11 можно вводить в присутствии адъюванта. Можно осуществлять мониторинг протекания иммунизации посредством обнаружения титров антител в плазме или сыворотке. Стандартный ELISA или другие иммунологические анализы можно использовать с иммуногеном в качестве антигена для того, чтобы оценивать уровни образования антител и/или уровне аффинности связывания.

После иммунизации животного антигенным препаратом GDF11 можно получать антисыворотки и, при желании, из сыворотки можно выделять поликлональные антитела. Для того чтобы получать моноклональные антитела, антителопродуцирующие клетки (лимфоциты) можно собирать у иммунизированного животного и сливать с помощью стандартных процедур слияния соматических клеток с иммортализирующими клетками, такими как миеломные клетки, чтобы получать гибридомные клетки. Такие способы хорошо известны в данной области и включают, например, гибридомный способ [см., например, Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-497], способ с гибридомами В-клеток человека [см., например, Kozbar et al. (1983) *Immunology Today*, 4:72], и способ с EBV-гибридомами, чтобы получать моноклональные антитела человека [Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. стр. 77-96]. Можно осуществлять иммунохимический скрининг гибридомных клеток на продуцирование антител со специфической реактивностью к полипептиду GDF11 и моноклональных антител, выделенных из культуры, содержащей такие гибридомные клетки.

В определенных вариантах осуществления одну или несколько модификаций аминокислот можно вводить в Fc-область антитела, предусмотренного в настоящем описании, тем самым создавая вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую модификацию аминокислоты (например, замену, делецию и/или добавление) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

Например, настоящее раскрытие предусматривает вариант антитела, которое обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают его желательным кандидатом для применений, в

которых время полужизни антитела *in vivo* является важным, но определенные эффекторные функции [например, комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)] являются не необходимыми или вредными. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* можно проводить для того, чтобы подтвердить снижение/истощение активностей CDC и/или ADCC. Например, анализы связывания Fc-рецептора (FcR) можно проводить для того, чтобы гарантировать, что у антитела отсутствует связывание Fc γ R (таким образом вероятно отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность связывать FcRn. Основные клетки, опосредующие ADCC, естественные киллерные клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гематопозитических клетках резюмирована, например, в Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492. Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC у молекулы, представляющей интерес, описаны в патенте США № 5500362; Hellstrom, I. et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063; Hellstrom, I et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; патенте США № 5821337; Bruggemann, M. et al. (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361. Альтернативно, не радиоактивные способы анализа можно использовать (например, АСТП™, не радиоактивный анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии; CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; и не радиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96®, Promega, Madison, Wis.). Подходящие эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и естественные киллерные клетки (NK). Альтернативно, или дополнительно, активность ADCC у молекулы, представляющей интерес, можно оценивать *in vivo*, например, в животной модели, такой как та, что раскрыта в Clynes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656. Анализы связывания C1q также можно проводить для того, чтобы подтвердить, что антитело неспособно связывать C1q и, таким образом, не обладает активностью CDC [см., например, ELISA связывания C1q и C3с в WO 2006/029879 и WO 2005/100402]. Для того чтобы оценивать активацию комплемента, можно осуществлять анализ CDC [см., например, Gazzano-Santoro et al. (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. et al. (2003) *Blood* 101:1045-1052; и Cragg, M. S. and M. J. Glennie (2004) *Blood* 103:2738-2743]. Определение связывания FcRn и клиренса/времени полужизни *in vivo* также можно осуществлять с использованием известных в данной области способов [см., например, Petkova, S. B. et al. (2006) *Intl. Immunol.* 18 (12):1759-1769]. Антитела по настоящему раскрытию со сниженной эффекторной функцией включают те, которые содержат замену одного или нескольких из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc-области (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают мутанты Fc с заменами в двух или больше из аминокислотных положений 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант "DANA" Fc с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

В определенных вариантах осуществления может быть желательно создавать антитела со сконструированным цистеином, например, "thioMAb", в которых один или несколько остатков антитела заменяют на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления замененные остатки появляются в доступных сайтах антитела. Посредством замены этих остатков на цистеин, реакционноспособные тиоловые группы, тем самым, располагают в доступных сайтах антитела, и их можно использовать для того, чтобы конъюгировать антитело с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственных средств или фрагменты "линкер-лекарственное средство", чтобы создавать иммуноконъюгат, как описано дополнительно в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления какой-либо один или несколько из следующих остатков можно заменять на цистеин: V205 (нумерация по Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация по EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация по EU) Fc-области тяжелой цепи. Антитела со сконструированным цистеином можно создавать, как описано, например, в патенте США № 7521541.

Кроме того, способы, используемые для скрининга антител, чтобы идентифицировать желательное антитело, могут влиять на свойства получаемого антитела. Например, если антитело подлежит использованию для связывания антигена в растворе, может быть желательно тестировать связывание в растворе. Множество различных способов доступно для тестирования взаимодействий между антителами и антигенами для того, чтобы идентифицировать особенно желательные антитела. Такие способы включают ELISA, анализы связывания посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, анализ связывания Biacore, Biacore AB, Uppsala, Sweden), сэндвич-анализы (например, система парамагнитных бус из IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), вестерн-блоттинг, анализы иммунопреципитации и иммуногистохимию.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены варианты аминокислотных последовательностей антител и/или связывающие полипептиды, предоставленные в настоящем описании. Например, может быть желательно усовершенствовать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела и/или связывающего полипептида. Варианты аминокислотных последовательностей антитела и/или связывающие полипептиды можно получать посредством введения подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело и/или связывающий полипептид, или посредством синтеза пептидов. Такие модификации включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела и/или связывающем полипептиде. Можно выполнять какую-либо комбинацию делеций, инсерций и замен, чтобы приходиться к конечной

конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, связыванием мишени (связыванием GDF11 и/или активина B).

Изменения (например, замены) можно создавать в HVR, например, для того, чтобы усовершенствовать аффинность антитела. Такие изменения можно создавать в "горячих точках" HVR т.е., остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутациям с высокой частотой во время процесса соматического созревания [см., например, Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)], и/или SDR (a-CDR), с тестированием получаемого варианта V_H или V_L на аффинность связывания. Созревание аффинности посредством конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек описано в данной области [см., например, Hoogenboom et al., в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)]. В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности, разнообразие вводят в вариабельные гены, выбранные для созревания, посредством какого-либо из различных способов (таких как ПЦР с внесением ошибок, перестановка цепей или направляемый олигонуклеотидами мутагенез). После этого создают вторичную библиотеку. Затем скрининг библиотеки осуществляют для того, чтобы идентифицировать какие-либо варианты антител с желаемой аффинностью. Другой способ внесения разнообразия включает HVR-направленные подходы, в которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатка за раз). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно идентифицировать конкретно, например, используя сканирующий аланиновый мутагенез или моделирование. В частности, мишенью часто являются CDR-H3 и CDR-L3.

В определенных вариантах осуществления замены, инсерции или делеции могут возникать в одной или нескольких HVR при условии, что такие изменения по существу не снижают способность антитела связываться с антигеном. Например, в HVR можно создавать консервативные изменения (например, консервативные замены, как предусмотрено в настоящем описании), которые по существу не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут быть вне "горячих точек" HVR или SDR. В определенных вариантах осуществления последовательностей вариантов V_H и V_L , предусмотренных выше, каждая HVR является или неизменной или содержит не больше чем одну, две или три замены аминокислот.

Эффективный способ идентификации остатков или участков антитела и/или связывающего полипептида, на которые можно направленно воздействовать для мутагенеза, называют "сканирующим аланиновым мутагенезом", как описано в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В этом способе остаток или группу целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как Asp, Arg, His, Lys и Glu) идентифицируют и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для того, чтобы определять, изменилось ли взаимодействие антитело-антиген. Дополнительные замены можно вводить в положениях аминокислот, демонстрирующих функциональную чувствительность к начальным заменам. Альтернативно, или дополнительно, кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело определяют для того, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и антигеном. Такие контактирующие остатки и соседствующие остатки можно подвергать направленному воздействию или элиминировать в качестве кандидатов на замену.

Можно осуществлять скрининг вариантов для того, чтобы определять, обладают ли они желаемыми свойствами.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают аминокислоты и/или карбоксиконцевые слияния в диапазоне длин от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или больше остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым метиониловым остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADERT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

В определенных вариантах осуществления антитело и/или связывающий полипептид, предусмотренные в настоящем описании, дополнительно можно модифицировать для того, чтобы они содержали дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области и легко доступны. Фрагменты, подходящие для получения производных антитела и/или связывающего полипептида, включают, но не ограничиваясь этим, водорастворимые полимеры.

Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или статистические сополимеры), и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликоля пропиональдегид может иметь преимущества при производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, прикрепленных к антителу и/или связывающему полипептиду, может варьировать, и если прикрепляют больше чем один полимер, они могут представлять собой одни и те же или различные молекулы. В целом, число и/или тип полимеров, используемых для получения производных, можно определять на основании соображений, включающих, в качестве неограничивающих примеров, конкретные свойства или функции антитела и/или связываю-

шего полипептида, подлежащего усовершенствованию, будут ли производное антитела и/или производное связывающего полипептида использовать в терапии при определенных условиях.

D. Низкомолекулярные антагонисты.

В других аспектах антагонист ALK4:ActRIIB представляет собой низкомолекулярное соединение (низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB) или комбинацию низкомолекулярных антагонистов. Низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов может ингибировать, например, один или несколько ALK4:ActRIIB-связывающих лигандов, рецептор I типа (например, ALK4), рецептор II типа (например, ActRIIB) и/или корецептор. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует передачу сигнала, опосредованную одним или несколькими ALK4:ActRIIB-связывающими лигандами, например, как определяют в анализе на основе клеток, таком как те, которые описаны в настоящем описании. Как раскрыто в настоящем описании, низкомолекулярные антагонисты ALK4:ActRIIB можно использовать отдельно или в комбинации с одной или несколькими поддерживающими терапиями или активными средствами, чтобы лечить пациента, нуждающегося в этом (например, субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с костями, заболеванием или состоянием, связанным с мышцами, или заболеванием или состоянием, связанным с избыточным или нежелательным жиром).

В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF11. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF8. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере активин (активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ). В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF11, GDF8 и активин. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK4. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP6. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF3. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP10. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов, как раскрыто в настоящем описании, не ингибирует или по существу не ингибирует BMP9.

Низкомолекулярные антагонисты ALK4:ActRIIB могут представлять собой прямые или не прямые ингибиторы. Например, не прямой низкомолекулярный антагонист или комбинация низкомолекулярных антагонистов может ингибировать экспрессию (например, транскрипцию, трансляцию, клеточную секрецию или их сочетания) по меньшей мере одного или нескольких лигандов суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [таких как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF11, BMP10, BMP6 и GDF3], рецептором I типа (например, ALK4), рецепторами II типа (например, ActRIIB) и/или одним или несколькими компонентами передачи сигнала ниже по каскаду (например, SMAD). Альтернативно, прямой низкомолекулярный антагонист или комбинация низкомолекулярных антагонистов непосредственно может связываться с и ингибировать, например, один или несколько лигандов суперсемейства TGF- β , которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB [таких как активин (например, активны А, активны В и активны АВ), GDF11, GDF8, BMP10, BMP6 и GDF3], рецепторами I типа (например, ALK4), рецепторами II типа (например, ActRIIB), корецепторами (например, Cripto или Scruptic) и/или компонентами передачи сигнала ниже по каскаду (например, SMAD). Комбинации одного или нескольких не прямых и одного или нескольких прямых низкомолекулярных антагонистов ALK4:ActRIIB можно использовать в соответствии со способами, описанными в настоящем описании.

Связывающие низкомолекулярные антагонисты по настоящему раскрытию можно идентифицировать и химически синтезировать с применением известного способа (см., например, публикацию РСТ №№ WO 00/00823 и WO 00/39585). В целом, низкомолекулярные антагонисты по раскрытию обычно составляют приблизительно меньше чем 2000 Да в размере, альтернативно приблизительно меньше чем 1500, 750, 500, 250 или 200 Да в размере, где такие органические низкомолекулярные соединения способны к связыванию, предпочтительно специфическому, с полипептидом, как раскрыто в настоящем описании. Эти низкомолекулярные антагонисты можно идентифицировать без излишних экспериментов, используя общеизвестные способы. В связи с этим, следует отметить, что способы скрининга библиотек небольших органических молекул на предмет молекул, которые способны связываться с целевым поли-

пептидом, хорошо известны в данной области (см., например, публикации международных патентов №№ WO 00/00823 и WO 00/39585).

Связывающие органические низкомолекулярные соединения по настоящему раскрытию могут представлять собой, например, альдегиды, кетоны, оксимы, гидразоны, семикарбазоны, карбазиды, первичные амины, вторичные амины, третичные амины, N-замещенные гидразины, гидразиды, спирты, простые эфиры, тиолы, простые тиоэфиры, дисульфиды, карбоновые кислоты, сложные эфиры, амиды, мочевины, карбаматы, карбонаты, кетали, тиокетали, ацетали, тиоацетали, арилгалогениды, арилсульфонаты, алкилгалогениды, алкилсульфонаты, ароматические соединения, гетероциклические соединения, анилины, алкены, алкины, диолы, аминоспирты, оксазолидины, оксазолины, тиазолидины, тиазолины, енамины, сульфонамиды, эпоксиды, азиридины, изоцианаты, сульфонилхлориды, диазо соединения и хлорангидриды.

Е. Полинуклеотидные антагонисты.

В других аспектах антагонист ALK4:ActRIIB представляет собой полинуклеотид (полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB) или комбинацию полинуклеотидов. Полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов может ингибировать, например, один или несколько ALK4:ActRIIB-связывающих лигандов [таких как активин (например, активин А, активин В и активин АВ), GDF8, GDF11, BMP10, BMP6 и GDF3], рецепторы I типа (например, ALK4), рецепторы II типа (например, ActRIIB), корецептор и/или компонент передачи сигнала ниже по каскаду (например, SMAD). В некоторых вариантах осуществления Полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует передачу сигнала, опосредованную одним или несколькими ALK4:ActRIIB-связывающими лигандами, например, как определяют в анализе на основе клеток, таком как то, что описано в настоящем описании. Как раскрыто в настоящем описании, полинуклеотидные антагонисты ALK4:ActRIIB можно использовать, отдельно или в комбинации с одной или несколькими поддерживающими терапиями или активными средствами, для лечения пациента, нуждающегося в этом (например, субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с костями, заболеванием или состоянием, связанным с мышцами, или заболеванием или состоянием, связанным с избыточным или нежелательным жиром).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные антагонисты ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибируют по меньшей мере GDF11. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF8. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере активин (активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин АЕ, активин ВС и/или активин ВЕ). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF11, GDF8 и активин. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK4. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP6. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP10. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный антагонист ALK4:ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов, как раскрыто в настоящем описании, не ингибирует или по существу не ингибирует BMP 9.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные антагонисты по раскрытию могут представлять собой антисмысловую нуклеиновую кислоту, молекулу RNAi [например, малую интерферирующую РНК (миРНК), малую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (мкРНК)], аптамер и/или рибозим. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот для GDF11, активина В, GDF8, активина А, BMP6, GDF3, ALK4, ActRIIB и BMP10 человека известны в данной области. Кроме того, многие различные способы создания полинуклеотидных антагонистов хорошо известны в данной области. Следовательно, полинуклеотидные антагонисты для использования в соответствии с этим раскрытием специалист в данной области может получать обычным образом на основании знаний в данной области и положений, предоставленных в настоящем описании.

Антисмысловую технологию можно использовать для того, чтобы управлять экспрессией гена через антисмысловую ДНК или РНК, или через формирование тройной спирали. Антисмысловые способы рассмотрены, например, в Okano (1991) *J. Neurochem.* 56:560; *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988). Формирование тройной спирали рассмотрено, например, в Cooney et al. (1988) *Science* 241:456; и Dervan et al., (1991) *Science* 251:1300. Способы основаны на связывании полинуклеотида с комплементарной ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые нуклеиновые кислоты содержат последовательность одноцепочечной РНК или ДНК,

которая комплементарна по меньшей мере части РНК транскрипта гена, описанного в настоящем описании. Однако абсолютная комплементарность не необходима, хотя и предпочтительна.

Последовательность, "комплементарная по меньшей мере части РНК", как упоминают в настоящем описании, обозначает последовательность, которая обладает достаточной комплементарностью, чтобы быть способной к гибридизации с РНК, образуя стабильный дуплекс; в случае двухцепочечных антисмысловых нуклеиновых кислот гена, описанного в настоящем описании, таким образом, можно тестировать одну цепь двухцепочечной ДНК или можно анализировать формирование тройной спирали. Способность к гибридизации зависит от степени комплементарности и длины антисмысловой нуклеиновой кислоты. В целом, чем больше гибридизуемая нуклеиновая кислота, тем больше она может содержать несовпадений оснований с РНК и при этом все еще формировать стабильную двойную спираль (или тройную спираль, в зависимости от случая). Специалист в данной области может устанавливать допустимую степень несовпадения, используя стандартные процедуры для того, чтобы определять температуру плавления гибридизованного комплекса.

Полинуклеотиды, которые комплементарны 5'-концу транскрипта, например, 5'-нетранслируемой последовательности вплоть до и включая иницирующий кодон AUG, должны работать наиболее эффективно при ингибировании трансляции. Однако показано, что последовательности, комплементарные 3'-нетранслируемым последовательностям мРНК, также эффективны при ингибировании трансляции мРНК [см., например, Wagner, R., (1994) *Nature* 372:333-335]. Таким образом, олигонуклеотиды, комплементарные 5'-или 3'-нетранслируемым некодирующим областям гена по раскрытию, можно использовать в антисмысловом подходе для того, чтобы ингибировать трансляцию эндогенной мРНК. Полинуклеотиды, комплементарные 5'-нетранслируемой области мРНК, должны содержать комплемент иницирующего кодона AUG. Антисмысловые полинуклеотиды, комплементарные кодирующим областям мРНК, представляют собой менее эффективные ингибиторы трансляции, но их можно использовать в соответствии со способами по настоящему раскрытию. Независимо от того, разрабатывают ли их для гибридизации с 5'-, 3'- или кодирующей областью мРНК по раскрытию, антисмысловые нуклеиновые кислоты должны составлять по меньшей мере шесть нуклеотидов в длину и предпочтительно представляют собой олигонуклеотиды в диапазоне от 6 приблизительно до 50 нуклеотидов в длину. В конкретных аспектах олигонуклеотид составляет по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 17 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов или по меньшей мере 50 нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления антисмысловую нуклеиновую кислоту по настоящему раскрытию получают внутриклеточно посредством транскрипции с экзогенной последовательности. Например, осуществляют транскрипцию вектора или его части с образованием антисмысловой нуклеиновой кислоты (РНК) гена по раскрытию. Такой вектор будет содержать последовательность, кодирующую желаемую антисмысловую нуклеиновую кислоту. Такой вектор может оставаться эпизомальным или встраиваться в хромосому, до тех пор пока его можно транскрибировать для того, чтобы получать желаемую антисмысловую РНК. Такие векторы можно сконструировать с помощью способов технологии рекомбинантных ДНК, стандартных в данной области. Векторы могут быть плазмидами, вирусными или другим, известным в данной области, используемым для репликации и экспрессии в клетках позвоночных. Экспрессия последовательности, кодирующей желаемые гены по данному раскрытию или их фрагменты, может быть опосредована каким-либо промотором, известным в данной области, чтобы действовать в клетках позвоночного, предпочтительно человека. Такие промоторы могут быть индуцибельными или конститутивными. Такие промоторы включают, но не ограничиваясь этим, участок раннего промотора SV40 [см., например, Benoist and Chambon (1981) *Nature* 290:304-310], промотор, содержащийся в длинном 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса [см., например, Yamamoto et al. (1980) *Cell* 22:787-797], тимидиновый промотор герпеса [см., например, Wagner et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445] и регуляторные последовательности гена металлотронеина [см., например, Brinster, et al. (1982) *Nature* 296:39-42].

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные антагонисты представляют собой молекулы интерферирующей РНК (RNAi), которые направленно воздействуют на экспрессию одного или нескольких из: GDF11, активина В, GDF8, активина А, BMP6, GDF3, BMP10, ALK4 и ActRIIB. RNAi относится к экспрессии РНК, которая интерферирует с экспрессией целевой мРНК. В частности, RNAi выключает целевой ген через взаимодействие с конкретной мРНК через миРНК (малую интерферирующую РНК). Затем двухцепочечный комплекс РНК отправляется на разрушение клеткой. Молекула миРНК представляет собой двухцепочечный РНК дуплекс от 10 до 50 нуклеотидов в длину, который мешает экспрессии целевого гена, который достаточно комплементарен (например, по меньшей мере 80% идентичность с геном). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична нуклеотидной последовательности целевого гена.

Дополнительные молекулы RNAi включают короткую шпилечную РНК (shRNA); также короткую интерферирующую шпилечную и микроРНК (мкРНК). Молекула shRNA содержит смысловые и антисмысловые последовательности из целевого гена, соединенного петлей. shRNA транспортируется из ядра в цитоплазму и она подвергается разрушению наряду с мРНК. Промоторы Pol III или U6 можно исполь-

зовать для того, чтобы экспрессировать РНК для RNAi.

Paddison et al. [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002] использовали малые молекулы РНК, уложенные в шпильки, в качестве средства воздействия на RNAi. Соответственно, такие молекулы короткой шпилечной РНК (shRNA) также благоприятно используют в способах, описанных в настоящем описании. Длина стебля и петли функциональных shRNA варьирует; длина стебля может находиться в диапазоне приблизительно от 25 приблизительно до 30 нуклеотидов, а размер петли может находиться в диапазоне между 4 и приблизительно 25 нуклеотидами, не влияя на активность сайленсинга. не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что эти shRNA похожи на продукты двухцепочечной РНК (дцРНК) РНКазы DICER и, в любом случае, обладают такой же способностью ингибировать экспрессию конкретного гена. shRNA можно экспрессировать с лентивирусного вектора. мкРНК представляет собой одноцепочечную РНК приблизительно от 10 до 70 нуклеотидов в длину, которая изначально транскрибируется в виде пре-мкРНК, отличающейся структурой "стебель-петля", которая впоследствии подвергается процессингу в зрелую мкРНК после дополнительного процессинга через RISC.

Молекулы, которые опосредуют RNAi, включая, без ограничения, миРНК, можно получать *in vitro* посредством химического синтеза (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), гидролиза дцРНК (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), посредством транскрипции *in vitro* с использованием РНК полимеразы T7 (Donzeet et al., Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002), и посредством гидролиза двухцепочечной РНК с использованием нуклеазы, такой как РНКазы III *E. coli* (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002).

По другому аспекту, раскрытие предусматривает полинуклеотидные антагонисты, включая в качестве неограничивающих примеров ловушку ДНК, двухцепочечную ДНК, одноцепочечную ДНК, ДНК, образующую комплекс, инкапсулированную ДНК, вирусную ДНК, плазмидную ДНК, оголенную РНК, инкапсулированную РНК, вирусную РНК, двухцепочечную РНК, молекулу, способную к РНК-интерференции, или их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные антагонисты по раскрытию представляют собой аптамеры. Аптамеры представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, включая молекулы двухцепочечной ДНК и одноцепочечной РНК, которые связываются и формируют третичные структуры, которые специфически связываются с целевой молекулой. Создание и терапевтическое использование аптамеров общепризнано в данной области (см., например, патент США № 5475096). Дополнительную информацию об аптамерах можно найти в публикации патентной заявки США № 20060148748. Аптамеры нуклеиновых кислот выбирают с использованием известных в данной области способов, например, через процесс систематической эволюции лигандов посредством экспоненциального обогащения (SELEX). SELEX представляет собой способ эволюции *in vitro* для молекул нуклеиновой кислоты с высоко специфическим связыванием с целевыми молекулами, как описано, например, в патенте США №№ 5475096; 5580737; 5567588; 5707796; 5763177; 6011577; и 6699843. Другой способ скрининга для того, чтобы идентифицировать аптамеры, описан в патенте США № 5270163. Процесс SELEX основан на способности нуклеиновых кислот формировать различные двух- и трехмерные структуры, а также на химической универсальности, которая доступна у нуклеотидных мономеров, чтобы действовать в качестве лигандов (формировать пары специфического связывания) практически с любым химическим соединением, мономерным или полимерным, включая другие молекулы нуклеиновой кислоты и полипептиды. Молекулы любого размера или состава могут служить в качестве мишеней. В способе SELEX используют отбор из смеси кандидатных олигонуклеотидов и поэтапные итерации связывания, разделения и амплификации, используя одну и ту же общую схему отбора, чтобы достигать желаемой аффинности связывания и избирательности. Начиная со смеси нуклеиновых кислот, которые могут содержать сегмент рандомизованной последовательности, способ SELEX включает стадии контакта смеси с мишенью в условиях, благоприятных для связывания; разделения несвязанных нуклеиновых кислот и тех нуклеиновых кислот, которые специфически связаны с целевыми молекулами; диссоциирования комплексов нуклеиновая кислота-мишень; амплификации нуклеиновых кислот, диссоциировавших из комплексов нуклеиновая кислота-мишень, чтобы получать обогащенную лигандами смесь нуклеиновых кислот. Стадии связывания, разделения, диссоциации и амплификации повторяют через столько циклов, сколько необходимо, чтобы получить лиганды из нуклеиновых кислот, которые связываются с высокой аффинностью и специфичностью с целевой молекулой.

Обычно такие связывающие молекулы вводят животному отдельно [см., например, O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560], но такие связывающие молекулы также можно экспрессировать *in vivo* с полинуклеотидов, захватываемых клеткой-хозяином и экспрессируемых *in vivo* [см., например, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)].

Ф. Фоллистатин и FLRG антагонисты.

Известно, что члены группы белков фоллистатина и FLRG антагонизируют лиганды, которые передают сигнал через путь ALK4:ActRIIB. Соответственно, в других аспектах, антагонистом ALK4:ActRIIB являются фоллистатин или полипептид FLRG, который можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными поддерживающими терапиями и/или активными средствами, как раскрыто в настоящем описании, чтобы достигать желаемого эффекта (например, для лечения паци-

ентов, имеющих почечное заболевание и/или метаболическое нарушение).

Термин "полипептид фоллистатина" включает полипептиды, содержащие какой-либо встречающийся в природе полипептид фоллистатина, а также какие-либо его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и пептидомиметики), которые сохраняют полезную активность и, кроме того, включает какой-либо функциональный мономер или мультимер фоллистатина. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды фоллистатина по раскрытию связывают активин и/или GDF8 и/или ингибируют его активность. Варианты полипептидов фоллистатина, которые сохраняют свойства связывания активина, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований, касающихся взаимодействий фоллистатина и активина. Например, в WO 2008/030367 раскрыты конкретные домены фоллистатина ("FSD"), которые, как показано, важны для связывания активина. Как показано далее в SEQ ID №№ 90-94, N-концевой домен фоллистатина ("FSND" SEQ ID № 92), FSD2 (SEQ ID № 94) и в меньшей степени FSD1 (SEQ ID № 93) представляют образцовые домены фоллистатина, которые важны для связывания активина. Кроме того, способы получения и тестирования библиотек полипептидов описаны выше в контексте полипептидов ActRII, и такие способы также относятся к созданию и тестированию вариантов фоллистатина. Полипептиды фоллистатина включают полипептиды, полученные из последовательности какого-либо известного фоллистатина, которые имеют последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичную последовательности полипептида фоллистатина, и необязательно по меньшей мере идентичную на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Примеры полипептидов фоллистатина включают зрелый полипептид фоллистатина или более короткие изоформы или другие варианты полипептида предшественника фоллистатина человека (SEQ ID № 90) как описано, например, в WO 2005/025601.

Изоформа FST344 полипептида предшественника фоллистатина человека представляет собой следующее:

```
1 MVRARHQPGG LLLLLLLLCO FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEDE DQDYSFPISS ILEW
(SEQ ID № 90; идентификационный номер NCBI NP_037541.1)
```

Сигнальный пептид подчеркнут; также выше подчеркнуты последние 27 остатков, которые представляют C-концевое удлинение, отличающее эту изоформу фоллистатина от более короткой изоформы фоллистатина FST317, которая представлена далее.

Изоформа FST317 полипептида предшественника фоллистатина человека представляет собой следующее:

```
1 MVRARHQPGG LLLLLLLLCO FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCN (SEQ ID № 91; идентификационный
номер NCBI NP_006341.1)
```

Сигнальный пептид подчеркнут.

Последовательность N-концевого домена фоллистатина (FSND) представляет собой следующее:

```
GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNC
IPCK (SEQ ID № 92; FSND)
```

Последовательности FSD1 и FSD2 представляют собой следующее:

```
ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID № 93; FSD1)
KTCRDVFPCGSSTCVVDQTNNAVCVT (SEQ ID № 94; FSD2)
```

В других аспектах антагонистом ALK4:ActRIIB является фоллистатин-подобный родственный ген (FLRG), также известный как родственный белок фоллистатина 3 (FSTL3). Термин "полипептид FLRG" включает полипептиды, содержащие какой-либо встречающийся в природе полипептид FLRG, а также какие-либо его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые конструкции и пептидомиметики), кото-

рые сохраняют полезную активность. В определенных вариантах осуществления полипептиды FLRG по раскрытию связывают и/или ингибируют активность активина, в частности, активина А. Варианты полипептидов FLRG, которые сохраняют свойства связывания активина, можно идентифицировать с использованием стандартных способов анализа взаимодействий FLRG и активина (см., например, US 6537966). Кроме того, способы получения и тестирования библиотек полипептидов описаны выше в контексте полипептидов ActRII и ALK4, и такие способы также относятся к созданию и тестированию вариантов FLRG. Полипептиды FLRG включают полипептиды, полученные из последовательности какого-либо известного FLRG, имеющего последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичную последовательности полипептида FLRG, и необязательно идентичную по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более.

Полипептид предшественника FLRG человека (предшественника родственного белка фоллистатина 3) представляет собой следующее:

```

1 MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMSGG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL
51 VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD
101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECELRA
151 ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC
201 PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP
251 PGGESAEIEEE NFV (SEQ ID № 95; идентификационный номер

```

NCBI NP_005851.1)

Сигнальный пептид подчеркнут.

В определенных вариантах осуществления функциональные варианты или модифицированные формы полипептидов фоллистатина и полипептидов FLRG включают слитые белки, имеющие по меньшей мере часть полипептида фоллистатина или полипептида FLRG и один или несколько доменов слияния, таких как, например, домены, которые облегчают выделение, обнаружение, стабилизацию или мультимеризацию полипептида. Подходящие домены слияния рассмотрены подробно выше со ссылкой на полипептиды ActRII. В определенном варианте осуществления, средство-антагонист по раскрытию представляет собой слитый белок, который содержит связывающую активин часть полипептида фоллистатина, слитого с Fc-доменом. В другом варианте осуществления средство-антагонист по раскрытию представляет собой слитый белок, который содержит связывающую активин часть полипептида FLRG, слитого с Fc-доменом.

5. Скрининговый анализ.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к использованию гетеромультимеров ALK4:ActRIIB для идентификации соединений (средств), которые являются агонистами или антагонистами рецепторов суперсемейства TGF-β. Соединения, идентифицированные через этот скрининг, можно тестировать для того, чтобы оценивать их способность модулировать ткани, такие как кость, хрящ, мышца, жир и/или нейроны, чтобы оценивать их способность модулировать рост ткани *in vivo* или *in vitro*. Эти соединения можно тестировать, например, в животных моделях.

Существует множество подходов для скрининга терапевтических средств для модулирования роста ткани посредством направленного воздействия на передачу сигнала лигандов суперсемейства TGF-β (например, передачу сигнала SMAD 2/3 и/или SMAD 1/5/8). В определенных вариантах осуществления высокопроизводительный скрининг соединений можно осуществлять для того, чтобы идентифицировать средства, которые нарушают опосредованные рецепторами суперсемейства TGF-β эффекты, которые оказывают на клеточную линию. В определенных вариантах осуществления анализ осуществляют для того, чтобы осуществлять скрининг и идентификацию соединений, которые специфически ингибируют или снижают связывание гетеромультимера ALK4:ActRIIB с его партнером связывания, таким как лиганд 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-β1, TGF-β2, TGF-β3, активин А, активин В, активин АВ, активин АС, NODAL, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). Альтернативно, анализ можно использовать для того, чтобы идентифицировать соединения, которые усиливают связывание гетеромультимера ALK4:ActRIIB с его партнером связывания, таким как лиганд суперсемейства TGF-β. В дополнительном варианте осуществления соединения можно идентифицировать по их способности взаимодействовать с гетеромультимерами ALK4:ActRIIB.

Существует достаточно различных форматов анализа, и, в свете настоящего раскрытия, специалист в данной области, тем не менее, будет подразумевать те, которые в явной форме не описаны в настоящем описании. Как раскрыто в настоящем описании, тестируемые соединения (средства) по изобретению можно создавать посредством любого комбинаторного химического способа.

Альтернативно, рассматриваемые соединения могут представлять собой встречающиеся в природе биомолекулы, синтезируемые *in vivo* или *in vitro*. Соединения (средства), подлежащие тестированию на

их способность действовать в качестве модуляторов роста ткани, можно получать, например, с помощью бактерий, дрожжей, растений или других организмов (например, естественные продукты), получать химически (например, низкомолекулярные соединения, включая пептидомиметики) или получать рекомбинантно. Тестируемые соединения, предусмотренные настоящим изобретением, включают не пептидные органические молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления тестовое средство представляет собой небольшую органическую молекулу, которая имеет молекулярную массу приблизительно меньше чем 2000 Да.

Тестируемые соединения по раскрытию можно предоставлять в виде отдельных дискретных сущностей или предоставлять в библиотеках более высокой сложности, например, полученных с помощью комбинаторной химии. Эти библиотеки могут содержать, например, спирты, алкилгалогениды, амины, амиды, сложные эфиры, альдегиды, простые эфиры и органические соединения других классов. Представление тестируемых соединений тестовой системе может быть или в выделенной форме или в виде смесей соединений, в частности, на начальных стадиях скрининга. Необязательно, можно получать производные соединений с использованием других соединений, и они могут иметь группы для получения производных, которые облегчают выделение соединений. Неограничивающие примеры групп для получения производных включают биотин, флуоресцеин, дигоксигенин, зеленый флуоресцентный белок, изотопы, полигистидин, магнитные бусы, глутатион S-трансферазу (GST), фотоактивируемые сшиватели или какие-либо их сочетания.

Во многих программах скрининга лекарственных средств, в которых тестируют библиотеки соединений и природных экстрактов, желателен высокопропускной анализ, чтобы максимизировать число соединений, рассматриваемых в данный период времени. Анализы, которые осуществляют в бесклеточных системах, такие как можно производить с использованием очищенных или получищенных белков, часто предпочтительны в качестве "первичного" скрининга в том отношении, что их можно создавать, чтобы делать возможной быструю разработку и относительно легкое обнаружение изменения в молекулярной мишени, которое опосредовано тестируемым соединением. Кроме того, эффекты клеточной токсичности или биодоступности тестируемого соединения в целом можно игнорировать в системе *in vitro*, вместо этого анализ в первую очередь сосредотачивают на эффекте лекарственного средства, оказываемом на молекулярную мишень, который может являться манифестацией изменения аффинности связывания между гетеромультимерами ALK4:ActRIIB и их партнером связывания (таким как 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, NODAL, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty).

Лишь в качестве иллюстрации, в образцовом скрининговом анализе по настоящему раскрытию соединения, представляющее интерес, приводят в контакт с выделенными и очищенными гетеромультимерами ALK4:ActRIIB, которые, как правило, способны связываться с лигандом суперсемейства TGF- β , в зависимости от ситуации, в целях анализа. В смесь соединения и гетеромультимера ALK4:ActRIIB после этого добавляют в композицию, содержащую подходящий лиганд 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, NODAL, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, MIS и Lefty). Обнаружение и количественное определение комплексов гетеромультимер-лиганд суперсемейства дает средство для определения эффекта соединения при ингибировании (или потенцировании) формирования комплекса между гетеромультимером ALK4:ActRIIB и связывающим его белком. Эффект соединения можно оценить, построив кривые доза-эффект по данным, получаемым с использованием тестируемого соединения в различных концентрациях. Кроме того, контрольный анализ также можно осуществлять для того, чтобы предоставлять базовый уровень для сравнения. Например, в контрольном анализе выделенный и очищенный лиганд суперсемейства TGF- β добавляют в композицию, содержащую гетеромультимер ALK4:ActRIIB, и количественно определяют формирование комплекса гетеромультимер-лиганд в отсутствие тестируемого соединения. Понятно, что, в целом, порядок, в котором смешивают реагенты, может варьировать, и их можно смешивать одновременно. Кроме того, вместо очищенных белков можно использовать клеточные экстракты и лизаты, чтобы создавать подходящую систему бесклеточного анализа.

Связывание гетеромультимера ALK4:ActRIIB с другим белком можно обнаруживать различными способами. Например, модуляцию формирования комплексов можно количественно определять с использованием, например, белков с метками, поддающимися обнаружению, таких как радиоактивно меченный (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченный (например, FITC) или ферментативно меченный гетеромер ALK4:ActRIIB и/или его связывающий белок, посредством иммунологического анализа или посредством хроматографического обнаружения.

В определенных вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает использование

анализа поляризации флуоресценции и анализа резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при измерении, непосредственно или опосредованно, степени взаимодействия между гетеромультимером ALK4:ActRIIB и его связывающим белком. Кроме того, другие способы обнаружения, такие как те, которые основаны на оптических волноводах (публикация PCT WO 96/26432 и патент США № 5677196), поверхностном плазмонном резонансе (SPR), датчиках поверхностных зарядов и датчиках поверхностных усилий, совместимы со многими вариантами осуществления по раскрытию.

Кроме того, настоящее раскрытие предусматривает использование анализа взаимодействия с ловушкой, также известного как "двухгибридный анализ", для идентификации средств, которые нарушают или потенцируют взаимодействие между гетеромультимером ALK4:ActRIIB и его партнером связывания. 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) *Biomethods* 14:920-924; и Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). В конкретном варианте осуществления настоящее раскрытие предусматривает использование обратных двухгибридных систем для того, чтобы идентифицировать соединения (например, низкомолекулярные соединения или пептиды), которые нарушают взаимодействия между гетеромультимером ALK4:ActRIIB и его связывающим белком [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 рассматриваемые соединения идентифицируют по их способности взаимодействовать с гетеромультимером ALK4:ActRIIB по раскрытию. Взаимодействие между соединением и гетеромультимером ALK4:ActRIIB может быть ковалентным или нековалентным. Например, такое взаимодействие можно идентифицировать при определенном уровне белка, используя биохимические способы *in vitro*, включая фотосшивание, связывание радиоактивно меченных лигандов и аффинную хроматографию [Jakoby WB et al. (1974) *Methods in Enzymology* 46:1]. В определенных случаях можно осуществлять скрининг соединений в анализе, основанном на определенном механизме, таком как анализ для обнаружения соединений, которые связываются с гетеромультимером ALK4:ActRIIB. Это может включать событие связывания на твердой фазе или в текучей фазе. Альтернативно, ген, кодирующий гетеромультимер ALK4:ActRIIB, можно трансфицировать с репортерной системой (например, β -галактозидаза, люцифераза или зеленый флуоресцентный белок) в клетку и осуществлять скрининг библиотеки, предпочтительно посредством высокопроизводительного скрининга или с использованием отдельных элементов библиотеки. Можно использовать другие анализы связывания на основе определенных механизмов; например, анализы связывания, в которых обнаруживают изменения свободной энергии. Анализы связывания можно осуществлять с использованием мишени, которая фиксирована в лунке, на бусине или чипе, или захвачена иммобилизованным антителом или разрешена с помощью капиллярного электрофореза. Обычно связанные соединения можно обнаруживать с использованием колориметрических конечных точек или флуоресценции или поверхностного плазмонного резонанса.

6. Образцовое терапевтическое использование.

В определенных вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB или комбинации антагонистов ALK4:ActRIIB по настоящему раскрытию можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать заболевание или состояние, которое связано с аномальной активностью ALK4:ActRIIB-связывающего лиганда. Эти заболевания, нарушения или состояния в целом обозначают в настоящем описании как "ALK4:ActRIIB-ассоциированные состояния" или "ALK4:ActRIIB-ассоциированные нарушения". В определенных вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает способы лечения или предотвращения ALK4:ActRIIB-ассоциированного состояния у индивидуума посредством введения индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеромультимера ALK4:ActRIIB, такого как гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов, как раскрыто в настоящем описании. Термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" являются взаимозаменяемыми на всем протяжении описания. Любые из антагонистов ALK4:ActRIIB по раскрытию потенциально можно использовать индивидуально или в комбинации для терапевтического использования, описанного в настоящем описании. Эти способы, в частности, направлены на терапевтическое и профилактическое лечение млекопитающих включая, например, грызунов, приматов и человека.

Как используют в настоящем описании, терапевтическое средство, которое "предотвращает" нарушение или состояние, относится к соединению, которое, в статистическом образце, снижает возникновение нарушения или состояния в образце, подвергаемом лечению, относительно контрольного образца без лечения или задерживает начало или снижает тяжесть одного или нескольких симптомов нарушения или состояния относительно контрольного образца без лечения. Термин "лечение", как используют в настоящем описании, включает уменьшение интенсивности или устранение состояния после того, как оно установлено. В любом случае, предотвращение или лечение можно усмотреть в диагнозе, поставленном врачом или другим поставщиком медицинских услуг, и предполагаемом результате введения терапевтического средства.

В целом, лечения или предотвращения заболевания или состояния, как описано в настоящем раскрытии, достигают посредством введения антагониста ALK4:ActRIIB или комбинаций таких антагонистов по настоящему раскрытию в "эффективном количестве". Эффективное количество средства отно-

сится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. "Терапевтически эффективное количество" средства по настоящему раскрытию может варьировать в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность средства вызывать желаемую реакцию у индивидуума. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата.

Встречающиеся в природе комплексы рецепторов ALK4 и ActRIIB и лиганда играют существенные роли в росте ткани, а также процессах раннего развития, таких как правильное формирование различных структур или в одной или нескольких способностях после развития, включая половое развитие, продуцирование гормонов гипофиза и образование кости и хряща. Таким образом, ALK4:ActRIIB-ассоциированные состояния включают, но не ограничиваясь этим, аномальный рост ткани и нарушения развития. Кроме того, ALK4:ActRIIB-ассоциированные состояния включают, но не ограничиваясь этим, нарушения клеточного роста и дифференцировки, такие как воспаление, аллергия, аутоиммунные заболевания и опухоли.

Например, ALK4:ActRIIB-ассоциированные состояния включают нервно-мышечные нарушения (например, мышечную дистрофию и атрофию мышц), застойное обструктивное заболевание легких (и мышечную атрофию, связанную с COPD), синдром мышечной атрофии, саркопению, кахексию, нарушения жировой ткани (например, ожирение), диабет 2-го типа (NIDDM, диабет зрелого возраста) и дегенеративное заболевание кости (например, остеопороз). Другие образцовые ALK4:ActRIIB-ассоциированные состояния включают мышечно-дегенеративные и нервно-мышечные нарушения, восстановление тканей (например, заживление ран), нейродегенеративные заболевания (например, амиотрофический боковой склероз) и иммунологические нарушения (например, нарушения, связанные с аномальной пролиферацией или функцией лимфоцитов).

В определенных вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по раскрытию можно использовать в качестве части лечения мышечной дистрофии. Термин "мышечная дистрофия" относится к группе дегенеративных мышечных заболеваний, отличающихся постепенным ослаблением и повреждением скелетных мышц и иногда сердца и дыхательных мышц. Мышечные дистрофии представляют собой генетические нарушения, отличающиеся прогрессирующей мышечной атрофией и слабостью, которые начинаются с микроскопических изменений в мышце. По мере дегенерации мышц с течением времени происходит снижение силы мышц человека. Образцовые мышечные дистрофии, которые можно лечить с использованием схемы, включающей рассматриваемые комплексы гетеромультимеров суперсемейства TGF- β , включают: мышечную дистрофию Дюшенна (DMD), мышечную дистрофию Беккера (BMD), мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса (EDMD), тазово-плечевую мышечную дистрофию (LGMD), плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FSH или FSHD) (также известную как дистрофия Ландузи-Дежерина), миотоническую дистрофию (MMD; также известную как болезнь Штейнера), окулофарингеальную мышечную дистрофию (OPMD), дистальную мышечную дистрофию (DD), врожденную мышечную дистрофию (CMD).

Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) впервые описана французским неврологом Гийомом Бенджамином Амандом Дюшеном в 1860-е годы. Мышечная дистрофия Беккера (BMD) названа после немецкого врача Петера Эмиля Беккера, который впервые описал этот вариант DMD в 1950-е годы. DMD является одним из наиболее часто наследуемых заболеваний у мужчин, которое поражает одного из 3500 мальчиков. DMD возникает, когда ген дистрофина, расположенный на коротком плече X хромосомы, является дефектным. Поскольку мужчины несут только одну копию X хромосомы, они имеют только одну копию гена дистрофина. Без белка дистрофина мышцы легко подвергаются повреждениям во время циклов сокращения и расслабления. Хотя в начале заболевания происходит компенсация мышц посредством регенерации, позднее мышечные клетки-предшественники не могут выдерживать постоянное повреждение и происходит замещение здоровой мышцы на нефункциональную фиброзно-жировую ткань.

BMD является результатом других мутаций в гене дистрофина. Пациенты с BMD имеют немного дистрофина, но он или присутствует в недостаточном количестве или обладает низким качеством. Присутствие некоторого количества дистрофина защищает мышцы пациентов с BMD от дегенерации также остро или также быстро, как у пациентов с DMD.

Исследования на животных показывают, что ингибирование пути передачи сигнала GDF8 позволяет 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, антагонисты ALK4:ActRIIB по раскрытию могут действовать в качестве ингибиторов (антагонистов) GDF8 и составляют альтернативное средство блокирования передачи сигнала посредством GDF8 и/или родственных лигандов суперсемейства TGF- β *in vivo* у пациентов с DMD и BMD.

Аналогичным образом, антагонисты ALK4:ActRIIB по раскрытию могут обеспечивать эффективное средство для увеличения мышечной массы при других патологических состояниях, при которых необхо-

дим рост мышц. Например, амиотрофический боковой склероз (ALS), также называемый болезнью Лу Герига или болезнью двигательных нейронов, представляет собой хроническое, прогрессирующее и неизлечимое заболевание ЦНС, которое поражает двигательные нейроны, которые являются компонентами центральной нервной системы, необходимыми для инициации сокращения скелетных мышц. При ALS происходит поражение двигательных нейронов и, в конечном итоге, их гибель, и хотя головной мозг человека обычно остается полностью функционирующим и в ясном сознании, инициация сокращения мышц блокирована на уровне спинного мозга. Индивидуумы, у которых развивается ALS, обычно имеют возраст между 40 и 70 годами и первыми разрушаются двигательные нейроны, которые иннервируют руки или ноги. Пациенты с ALS могут иметь нарушение походки, могут ронять вещи, падать, невнятно говорить и неконтролируемо смеяться или кричать. По мере развития заболевания, мышцы в конечностях начинают атрофироваться из-за неиспользования. Мышечная слабость становится изнуряющей и пациентам в конечном итоге требуется инвалидное кресло или они становятся прикованными к постели. Большинство пациентов с ALS погибают от дыхательной недостаточности или осложнений при искусственной вентиляции, таких как пневмония, через 3-5 лет после начала заболевания.

От содействия увеличению мышечной массы посредством антагонистов ALK4:ActRIIB также могут выигрывать те, кто страдает от мышечных атрофических заболеваний. Gonzalez-Cadavid et al. (выше) сообщали, что у людей экспрессия GDF8 имеет обратную корреляцию с массой тела без жира и что увеличенная экспрессия гена GDF8 связана с потерей массы у мужчин с ВИЧ-кахекией. Ингибируя функцию GDF8 у пациентов со СПИД, можно облегчать, если не полностью устранять, по меньшей мере определенные симптомы СПИД, таким образом, значительно повышая качество жизни у пациентов со СПИД.

Поскольку утрата функции GDF8 также связана с потерей жира без уменьшения потребления питательных веществ (Zimmers et al., выше; McPherron and Lee, выше), рассматриваемые антагонисты ALK4:ActRIIB дополнительно можно использовать в качестве терапевтического средства для замедления или предотвращения развития ожирения и диабета 2-го типа.

Синдром анорексии-кахекии при злокачественных опухолях находится среди наиболее изнуряющих и опасных для жизни аспектов злокачественных опухолей. Этот синдром является общим признаком злокачественных опухолей многих типов - присутствует приблизительно у 80% пациентов со злокачественными опухолями в момент смерти - и является причиной не только низкого качества жизни и слабого ответа на химиотерапию, но также более короткого времени выживаемости, чем у пациентов со сравнимыми опухолями, но без потери массы. Кахекию обычно предполагают у пациентов со злокачественными опухолями в случае возникновения непреднамеренной потери массы больше пяти процентов от предклинической массы в течение шестимесячного периода. Связанная с анорексией, потерей жировой и мышечной ткани и психологического дистресса, кахекия возникает из комплексного взаимодействия между злокачественной опухолью и организмом-носителем. Кахекия при злокачественной опухоли влияет на образование цитокинов, высвобождение факторов, мобилизующих липиды и индуцирующих протеолиз, и изменения в промежуточном метаболизме. Несмотря на то, что анорексия является типичной, только сниженное потребление пищи не способно объяснить изменения композиции организма, наблюдаемые у пациентов со злокачественными опухолями, и увеличение потребления питательных веществ неспособно обратить синдром истощения. В настоящее время, не существует лечения для того, чтобы контролировать процесс кахекии или обращать его. Поскольку обнаружено, что системная сверхэкспрессия GDF8 у взрослых мышей индуцирует обширную потерю мышц и жира, аналогичную тому, что наблюдают при синдроме кахекии у человека (Zimmers et al., выше), рассматриваемые антагонисты ALK4:ActRIIB можно полезно использовать для того, чтобы предотвращать, лечить или облегчать симптомы синдрома кахекии, при котором желателен рост мышц. Примером гетеромерного комплекса, который можно использовать для предотвращения, лечения или облегчения потери мышцы, как описано выше, является гетеродимер ALK4:ActRIIB.

В определенных вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинацию таких антагонистов по настоящему раскрытию можно использовать в способах индукции формирования кости и/или хряща, предотвращения потери кости, увеличения минерализации кости, предотвращения деминерализации кости и/или увеличения плотности кости. Антагонисты ALK4:ActRIIB можно использовать у пациентов с диагнозом предклинической низкой плотности кости в качестве защитной меры против развития остеопороза.

В некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию могут обладать медицинской полезностью при заживлении переломов костей и дефектов хряща у человека и других животных. Рассматриваемые способы и композиции также могут иметь профилактическое использование для уменьшения закрытых, а также открытых переломов, а также для усовершенствованной фиксации искусственных суставов.

Формирование кости *de novo*, индуцируемое остеогенным средством, можно использовать для восстановления черепно-лицевых дефектов, которые являются врожденными, вызванными травмой или обусловленными онкологической резекцией, а также можно использовать в косметической пластической

хирургии. Кроме того, способы и композиции по изобретению можно использовать при лечении периодонтальных заболеваний, а также в других процессах восстановления зубов. В определенных случаях, антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов могут обеспечивать окружение для привлечения клеток, формирующих кость, стимулировать рост клеток, формирующих кость, или индуцировать дифференцировку предшественников клеток, формирующих кость. Антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по раскрытию также можно использовать в лечении остеопороза. Кроме того, антагонисты ALK4:ActRIIB можно использовать при восстановлении дефектов хряща и предотвращения/обращения остеоартрита. Примерами гетеромерных комплексов, которые можно использовать для индукции формирования кости, предотвращения потери кости, повышения минерализации кости, предотвращения деминерализации кости и/или увеличения плотности кости, как раскрыто в настоящем описании, являются гетеродимеры ALK4:ActRIIB.

В Rosen et al. (ред.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7-е изд. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C. (включено в настоящее описание посредством ссылки) приведено всестороннее обсуждение нарушений кости, которые можно подвергать лечению антагонистом ALK4:ActRIIB или комбинациями таких антагонистов. Частичный список рассмотрен в настоящем описании. Способы и композиции по изобретению можно применять при состояниях, отличающихся потерей кости или вызывающих ее, таких как остеопороз (включая вторичный остеопороз), гиперпаратиреозидизм, минеральное нарушение кости при хронической почечной недостаточности, половую гормональную депривацию или абляцию (например, андрогенную и/или эстрогенную), лечение глюкокортикоидами, ревматоидный артрит, тяжелые ожоги, гиперпаратиреозидизм, гиперкальцемию, гипокальцемию, гипофосфатемию, остеомалацию (включая остеомалацию, индуцированную опухолью), гиперфосфатемию, дефицит витамина D, гиперпаратиреозидизм (включая семейный гиперпаратиреозидизм) и псевдогипопаратиреозидизм, метастазы опухоли в кость, потерю кости как следствие опухоли или химиотерапии, опухоли кости и костного мозга (например, множественную миелому), ишемические нарушения кости, периодонтальные заболевания и потерю кости рта, синдром Кушинга, болезнь Паджета, тиреотоксикоз, состояние хронической диареи или мальабсорбции, почечный канальцевый ацидоз или нервную анорексию. Способы и композиции по изобретению также можно применять при состояниях, отличающихся неспособностью формирования или заживления кости, включая несрастающиеся переломы, переломы, которые медленно заживают в иных случаях, фетальную или неонатальную дисплазию кости (например, гипокальцемию, гиперкальцемию, дефекты кальциевых рецепторов и дефицит витамина D), остеонекроз (включая остеонекроз челюсти) и несовершенный остеогенез. Дополнительно, анаболические эффекты таких антагонистов будут вызывать уменьшение боли в костях, связанной с повреждением или эрозией кости. Вследствие антирезорбтивных эффектов такие антагонисты можно использовать для лечения нарушений аномального формирования кости, таких как метастазы остеобластных опухолей (например, связанных с первичной злокачественной опухолью предстательной железы или молочной железы), остеогенная остеосаркома, остеопетроз, прогрессирующая диафизная дисплазия, внутрикостный гиперостоз, остеопойкилоз и мелорестоз. Другие нарушения, которые можно лечить, включают фиброзную дисплазию и хондродисплазию.

В другом конкретном варианте осуществления раскрытие предусматривает терапевтический способ и композицию для восстановления переломов и других состояний, связанных с дефектами хряща и/или кости, или периодонтальных заболеваний. Изобретение дополнительно предусматривает терапевтические способы и композиции для заживления ран и восстановления тканей. Типы ран включают, но не ограничиваясь этим, ожоги, разрезы и язвы. См., например, публикацию PCT № WO 84/01106. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из антагонистов ALK4:ActRIIB по раскрытию в смеси с фармацевтически приемлемым наполнителем, носителем или матрицей.

В некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по раскрытию можно применять при состояниях, вызывающих потерю кости, такую как остеопороз, гиперпаратиреозидизм, синдром Кушинга, тиреотоксикоз, состояние хронической диареи или мальабсорбция, почечный канальцевый ацидоз или нервная анорексия. Обычно считают, что женский пол, наличием низкой массы тела и ведение сидячего образа жизни являются факторами риска для остеопороза (потери плотности минералов в кости, ведущей к риску перелома). Однако остеопороз также может быть результатом долгосрочного использования определенных лекарственных средств. Остеопороз, являющийся результатом лекарственных средств или других медицинских состояний, известен как вторичный остеопороз. При синдроме Кушинга избыточное количество кортизола, продуцируемого организмом, ведет к остеопорозу и переломам. Наиболее распространенными лекарственными средствами, связанными со вторичным остеопорозом, являются кортикостероиды, класс лекарственных средств, которые действуют подобно кортизолу, гормону, в норме продуцируемому надпочечниками. Несмотря на то, что адекватные уровни гормонов щитовидной железы необходимы для развития скелета, избыток гормона щитовидной железы может снизить массу кости с течением времени. Антациды, содержащие алюминий, могут вести к потере кости при приеме в высоких

дозах людьми с проблемами почек, в частности, теми, кто проходит диализ. Другие лекарственные средства, которые могут вызывать вторичный остеопороз, включают фенитоин (Дилантин) и барбитураты, которые используют для того, чтобы предотвращать пароксизмы; метотрексат (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), лекарственные средства для некоторых форм артрита, злокачественных опухолей и иммунных нарушений; циклоспорин (сандиммун, неорал), лекарственные средства, используемые для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний и подавления иммунной системы у пациентов с трансплантатами органов; агонисты рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (люпрон, Zoladex), используемые для лечения злокачественной опухоли предстательной железы и эндометриоза; гепарин (Calciparine, Liqueamin), антикоагулянты; и холестирамин (Questran) и колестипол (Colestid), используемые для лечения высокого холестерина. Потеря кости в результате терапии злокачественных опухолей широко известна и называется потерей кости, вызванной терапией злокачественной опухоли (CTIBL). Метастазы в кости могут создавать полости в кости, которые можно корректировать с помощью лечения антагонистом ALK4:ActRIIB (например, гетеродимером ALK4:ActRIIB). Потеря кости также может быть обусловлена заболеванием десен, хронической инфекцией, при которой бактерии, находящиеся в десневых карманах, продуцируют токсины и вредоносные ферменты.

В дополнительном варианте осуществления настоящее раскрытие предусматривает способы и терапевтические средства для лечения заболеваний или нарушений, связанных с аномальным или нежелательным ростом кости. Например, пациенты со врожденным нарушением прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (FOP) поражены прогрессирующим эктопическим ростом кости в мягких тканях самопроизвольно или в ответ на травму ткани, со значительным воздействием на качество жизни. Дополнительно, аномальный рост кости может происходить после хирургического замещения тазобедренного сустава и, таким образом, уничтожать хирургический результат. Это является наиболее общим примером патологического роста кости и ситуации, в которой рассматриваемые способы и композиции могут быть терапевтически эффективными. Те же способы и композиции также могут быть эффективными для лечения других форм аномального роста кости (например, патологического роста кости после травмы, ожогов или повреждения спинного мозга) и для лечения или предотвращения нежелательных состояний, связанных с аномальным ростом кости, наблюдаемым в связи с метастатической злокачественной опухолью предстательной железы или остеосаркомой.

В определенных вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по раскрытию можно использовать для того, чтобы содействовать формированию кости у пациентов со злокачественной опухолью. Пациенты, имеющие определенные опухоли (например, предстательной железы, молочной железы, множественную миелому или какую-либо опухоль, вызывающую гиперпаратиреозидизм), имеют высокий риск потери кости из-за индуцированной опухолью потери кости, метастазов кости и терапевтических средств. Таких пациентов можно лечить с использованием гетеромультимерного комплекса суперсемейства TGF- β или комбинации комплексов, даже в отсутствие признаков потери кости или метастазов кости. Также можно осуществлять мониторинг пациентов на признаки потери кости или метастазов кости и можно осуществлять лечение антагонистом ALK4:ActRIIB в том случае, если индикаторы указывают на повышенный риск. В целом, сканирование DEXA используют для того, чтобы оценивать изменения плотности кости, а индикаторы ремоделирования кости можно использовать для того, чтобы оценивать вероятность метастазов кости. Можно осуществлять мониторинг маркеров сыворотки. Специфичная щелочная фосфатаза кости (BSAP) представляет собой фермент, который присутствует в остеобластах. Уровни BSAP в крови повышены у пациентов с метастазами кости и другими состояниями, которые ведут к увеличенному ремоделированию кости. Пептиды остеокальцина и проколлагена также связаны с формированием кости и метастазами кости. Увеличение BSAP обнаружено у пациентов с метастазами кости, обусловленными злокачественной опухолью предстательной железы, и в меньшей степени при метастазах кости от злокачественной опухоли молочной железы. Уровни BMP7 повышены при злокачественной опухоли предстательной железы, которая метастазировала в кость, но не при метастазах кости из-за злокачественной опухоли мочевого пузыря, опухоли, печени или легких. Карбоксиконцевой телопептид I типа (ICTP) представляет собой сшиватель, обнаруженный в коллагене, который образуется при резорбции кости. Поскольку постоянно происходит разрушение и повторное формирование кости, ICTP встречается во всем организме. Однако в месте метастаза кости уровень будет значительно выше, чем в области нормальной кости. Высокие уровни ICTP обнаружены в метастазе кости из-за злокачественной опухоли предстательной железы, легких и молочной железы. Другой сшиватель коллагена, N-концевой телопептид I типа (NTx), образуется наряду с ICTP во время ремоделирования кости. Количество NTx увеличено в метастазах кости, обусловленных злокачественными опухолями многих различных типов, включая злокачественные опухоли легких, предстательной железы и молочной железы. Также уровни NTx возрастают при прогрессировании метастазов кости. Следовательно, этот маркер можно использовать как для обнаружения метастазов, так и для измерения степени заболевания. Другие маркеры резорбции включают пиридинолин и дезоксипиридинолин. Какое-либо увеличение маркеров резорбции или маркеров метастазов кости указывает на необходимость терапии пациента антагонистом ALK4:ActRIIB.

В другом варианте осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер

ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов можно использовать у пациентов с минеральным нарушением кости при хронической почечной недостаточности (СКД-MBD), обширном синдроме взаимосвязанных скелетных, сердечно-сосудистых и минерально-метаболических нарушений, возникающих из-за почечного заболевания. СКД-MBD охватывает различные скелетные патологии, часто обозначаемые как нефрогенная остеодистрофия (ROD), что является предпочтительным вариантом осуществления для лечения антагонистом ALK4:ActRIIB (например, гетеродимером ALK4:ActRIIB) или комбинациями таких антагонистов. В зависимости от относительного вклада различных патогенных факторов, манифестация ROD имеет разнообразные патологические паттерны ремоделирования кости (Hruska et al., 2008, Chronic kidney disease mineral bone disorder (СКД-MBD); в Rosen et al. (ред.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7-е изд. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C., pp 343-349). На одном конце спектра находится ROD с умеренной остеодистрофией и слабым ремоделированием кости, которая отличается низким числом активных участков ремоделирования, глубоко подавленным формированием кости и слабой резорбцией кости. Другой крайностью является ROD с гиперпаратиреоидизмом, высоким ремоделированием кости и фиброзным оститом. Учитывая, что антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов могут оказывать как анаболические, так и антирезорбтивные эффекты, эти средства можно использовать у пациентов по всему спектру ROD патологий.

Антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по раскрытию можно совместно вводить с другими фармацевтическими средствами, активными в кости. Совместное введение можно выполнять посредством введения одного совместного состава, посредством одновременного введения или посредством введения в отдельные моменты времени, антагонисты ALK4:ActRIIB могут быть особенно благоприятными, если их вводят с другими средствами, активными в кости. Пациент может выигрывать от совместного приема антагонистического комплекса ALK4:ActRIIB и кальциевых добавок, витамина D, выполнения подходящих упражнений и/или, в некоторых случаях, приема других лекарственных средств. 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 относятся к классу антирезорбтивных лекарственных средств. Ремоделирование кости состоит из двух четких стадий: резорбция кости и формирование кости. Антирезорбтивные лекарственные средства замедляют или останавливают резорбцию кости в цикле ремоделирования кости, но не замедляют формирование кости в этом цикле. Как результат, новое формирование продолжается с более высокой скоростью, чем резорбция кости, и плотность кости может возрастать с течением времени. Терипаратид, форма паратиреоидного гормона, увеличивает скорость формирования кости в цикле ремоделирования кости. Аллендронат одобрен как для предотвращения (5 мг в сутки или 35 мг раз в неделю) и лечения (10 мг в сутки или 70 мг раз в неделю) постменопаузального остеопороза. Аллендронат снижает потерю кости, увеличивает плотность кости и снижает риск переломов позвоночника, запястья и бедра. Аллендронат также одобрен для лечения индуцированного глюкокортикоидами остеопороза у мужчин и женщин в результате долгосрочного использования этих лекарственных средств (т.е., преднизона и кортизона) и для лечения остеопороза у мужчин.

Алендронат+витамин D одобрены для лечения остеопороза у женщин после менопаузы (70 мг раз в неделю+витамин D) и для лечения, чтобы увеличивать массу кости у мужчин с остеопорозом. Ибандронат одобрен для предотвращения и лечения постменопаузального остеопороза. Ибандронат (150 мг) следует принимать в виде пилюли раз в месяц каждый месяц в один и тот же день. Ибандронат снижает потерю кости, увеличивает плотность кости и снижает риск переломов позвоночника. Ризедронат одобрен для предотвращения и лечения постменопаузального остеопороза. Ризедронат при приеме ежедневно (доза 5 мг) или еженедельно (доза 35 мг или 35 мг с кальцием) замедляет потерю кости, увеличивает плотность кости и снижает риск переломов позвоночника и других костей. Ризедронат также одобрен для использования у мужчин и женщин для того, чтобы предотвращать и/или лечить индуцированный глюкокортикоидами остеопороз, который является результатом долгосрочного использования этих лекарственных средств (т.е., преднизона или кортизона). Кальцитонин представляет собой встречающийся в природе гормон, участвующий в регуляции кальция и метаболизме кости. У женщин, после больше чем 5 лет после менопаузы, кальцитонин замедляет потерю кости, увеличивает плотность кости в позвоночнике и может облегчать боль, связанную с переломами костей. Кальцитонин снижает риск переломов позвоночника. Кальцитонин доступен в виде инъекции (50-100 МЕ ежедневно) или назального спрея (200 МЕ ежедневно).

Пациент также может получать пользу от совместного приема антагониста ALK4:ActRIIB или комбинаций таких антагонистов и дополнительных лекарственных средств, активных в кости. Терапия эстрогеном (ЕТ)/гормональная терапия (НТ) одобрена для предотвращения остеопороза. Показано, что ЕТ снижает потерю кости, увеличивает плотность кости как в позвоночнике, так и в бедре, и снижает риск переломов бедра и позвоночника у женщин после менопаузы. ЕТ вводят наиболее часто в форме пилюль или трансдермального пластыря, который доставляет низкую дозу приблизительно 0,3 мг ежедневно или стандартную дозу приблизительно 0,625 мг ежедневно, и он эффективен даже когда начинают в возрасте

старше 70 лет. Когда эстроген принимают отдельно, он может увеличивать у женщин риск развития злокачественной опухоли слизистой оболочки матки (злокачественной опухоли эндометрия). Чтобы устранить этот риск, поставщики медицинских услуг назначают гормон прогестин в комбинации с эстрогеном (заместительная гормональная терапия или НТ) тем женщинам, которые имеют интактную матку. Показано, что ЕТ/НТ облегчают симптомы менопаузы и оказывают положительный эффект на здоровье костей. Побочные эффекты могут включать вагинальное кровотечение, болезненность молочных желез, колебания настроения и заболевание желчного пузыря. Ралоксифен, 60 мг в день, одобрен для предотвращения и лечения постменопаузального остеопороза. Он относится к классу лекарственных средств, называемых избирательными модуляторами эстрогеновых рецепторов (SERM), которые разработаны для обеспечения положительных эффектов эстрогенов без их потенциальных недостатков. Ралоксифен увеличивает массу кости и снижает риск переломов позвоночника. Еще не доступны данные, которые могут демонстрировать, что ралоксифен может снижать риск переломов бедра и других костей не из позвоночника. Терипаратид, форма паратиреоидного гормона, одобрен для лечения остеопороза у женщин после менопаузы и мужчин, которые имеют высокий риск переломов. Это лекарственное средство имитирует формирование новой кости и значительно увеличивает минеральную плотность кости. У женщин после менопаузы отмечено снижение переломов в позвоночнике, бедре, стопе, ребрах и запястье. У мужчин отмечено снижение переломов позвоночника, но нет достаточных данных для того, чтобы оценивать снижение переломов в других местах. Терипаратид самостоятельно вводят в виде ежедневных инъекций вплоть до 24 месяцев.

В других вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB или комбинации таких антагонистов можно использовать для регуляции содержания жира в организме у животного и для лечения или предотвращения состояний, связанных с ним, и, в частности, состояний, нарушающих здоровье, которые связаны с ним. В соответствии с настоящим изобретением, регулирование (контроль) массы тела может относиться к снижению или увеличению массы тела, снижению или увеличению скорости увеличения массы или снижению или увеличению скорости потери массы, и также включает активное поддержание или незначительное изменение массы тела (например, вопреки внешним или внутренним влияниям, которые иначе могут увеличивать или уменьшать массу тела). Один из вариантов осуществления по настоящему изобретению относится к регулированию массы тела посредством введения животному (например, человеку), нуждающемуся в этом, гетеромультимерного комплекса суперсемейства TGF- β или комбинаций гетеромультимерных комплексов суперсемейства TGF- β по раскрытию.

В некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию можно использовать для снижения массы тела и/или снижения увеличения массы у животного, и более конкретно, для лечения или облегчения ожирения у пациентов с риском ожирения или страдающих им. В другом конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение направлено на способы и соединения для лечения животного, которое не способно набирать или сохранять массу (например, животного с синдромом истощения). Такие способы эффективны для увеличения массы и/или веса тела или для снижения потери массы и/или веса или для улучшения состояний, связанных с или обусловленных нежелательно низкой (например, нездоровой) массой и/или весом тела. Кроме того, нарушения с высоким холестерином (например, гиперхолестеринемия или дислипидемия) можно лечить антагонистом ALK4:ActRIIB или комбинациями таких антагонистов по раскрытию.

В других вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов можно использовать для регуляции содержания жира в организме животного и для лечения или предотвращения состояний, связанных с ним, и, в частности, состояний, нарушающих здоровье, которые связаны с ним. В соответствии с настоящим изобретением, регулирование (контроль) массы тела может относиться к снижению или увеличению массы тела, снижению или увеличению скорости увеличения массы или увеличению или снижению скорости потери массы, и также включает активное поддержание или незначительное изменение массы тела (например, вопреки внешним или внутренним влияниям, которые могут иначе увеличивать или уменьшать массу тела). Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к регулированию массы тела посредством введения животному (например, человеку), нуждающемуся в этом, антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинаций таких антагонистов. Например, в некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать нарушение или состояние, выбранное из ожирения (например, ожирения по абдоминальному типу); избыточного веса; резистентности к инсулину; метаболического синдрома и других метаболических заболеваний или состояний; липидных нарушений, таких как, низкие уровни HDL, высокие уровни LDL, гиперлипидемия, гипертриглицеридемия или дислипидемия; отклонений липопротеинов от нормы; сниженных триглицеридов; воспаления (например, воспаления печени и/или воспаления жировой ткани), жирового заболевания печени; заболевания неалкогольного ожирения печени; гипергликемии; ослабленной толерантности к глюкозе (IGT); гиперинсулинемии; высокого холестерина (например, высоких уровней LDL и гиперхолестеринемии); сердечно-сосудистого заболевания, такого как заболева-

ние сердца, включая коронарное заболевание сердца, застойную сердечную недостаточность, инсульт, заболевание периферических сосудов, атеросклероз; артериосклероза и гипертензии; синдрома Х; сосудистого рестеноза; нейропати; ретинопатии; нейродегенеративного заболевания; нарушения функции эндотелия, нарушения функции дыхания; панкреатита; синдрома поликистоза яичников; повышенных уровней мочевой кислоты; гемохроматоза (перегрузки железом); акантокератодермии (темных пятен на коже); или злокачественной опухоли (например, яичника, молочной железы, эндометрия и злокачественной опухоли ободочной кишки); или других нарушений/состояний, связанных с одним или несколькими из приведенных выше заболеваний или состояний. В некоторых вариантах осуществления заболевания или состояния, которое лечат с использованием антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинаций таких антагонистов, связаны с избыточным весом (например, $BMI \geq 25$ kg/m^2) или со слишком большим количеством жира в организме.

В одном из вариантов осуществления раскрытие предусматривает способ снижения массы тела, включающий введение субъекту, желающему снизить массу тела или нуждающемуся в этом, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинаций таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет избыточный вес (например, предожирение). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет индекс массы тела (BMI) 25 kg/m^2 или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 25 kg/m^2 до 29,9 kg/m^2 , от 30 kg/m^2 до 39,9 kg/m^2 , от 25 kg/m^2 до 39,9 kg/m^2 или от 25 kg/m^2 до 50 kg/m^2 . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет ожирение. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 30 kg/m^2 или выше (например, от 30 до 39,9 kg/m^2 или от 30 kg/m^2 до 50 kg/m^2). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает патологическим ожирением. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 40 kg/m^2 или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 40 kg/m^2 до 45 kg/m^2 или от 40 kg/m^2 до 50 kg/m^2 . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет центральное ожирение (например, избыточную тучность в абдоминальной области, включая жир на животе и/или внутренний жир). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет соотношение охвата талии/бедр (WHR) 0,85 или выше. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет периферическое ожирение (например, избыточную тучность на бедрах). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет сахарный диабет 2-го типа. Антагонист ALK4:ActRIIB или комбинацию антагонистов можно вводить отдельно или в виде комбинированного лечения поддерживающей терапии другого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления поддерживающая терапия представляет собой диету и/или упражнения.

В одном из вариантов осуществления раскрытие предусматривает способ снижения увеличения массы, включающий введение субъекту, желающему снизить увеличение массы или нуждающемуся в этом, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет избыточный вес (например, предожирение). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 25 kg/m^2 или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 25 kg/m^2 до 29,9 kg/m^2 , от 30 kg/m^2 до 39,9 kg/m^2 , от 25 kg/m^2 до 39,9 kg/m^2 или от 25 kg/m^2 до 50 kg/m^2 . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет ожирение. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 30 kg/m^2 или выше (например, от 30 до 39,9 kg/m^2 или от 30 kg/m^2 до 50 kg/m^2). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает патологическим ожирением. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 40 kg/m^2 или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 40 kg/m^2 до 45 kg/m^2 или от 40 kg/m^2 до 50 kg/m^2 . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет сахарный диабет 2-го типа.

Также предоставлен способ лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с избыточной массой тела, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении или предотвращении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой ожирение. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой резистентность к инсулину. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из: дислипидемии, гиперлипидемии (уровень общего холестерина >240 мг/дл), гиперхолестеринемии (например, уровень общего холестерина >200 мг/дл, >220 мг/дл, >240 мг/дл, >250 мг/дл или >275 мг/дл), низкого уровня HDL в сыворотке (например, <40 мг/дл, <45 мг/дл, или <50 мг/дл), высокого уровня LDL в сыворотке (например, ≥ 100 мг/дл, ≥ 130 мг/дл, ≥ 160 мг/дл или ≥ 190 мг/дл), и гипертриглицеридемии (например, уровень TG натощак ≥ 150 мг/дл, ≥ 175 мг/дл, ≥ 200 мг/дл, ≥ 300 мг/дл, ≥ 400 мг/дл или ≥ 499 мг/дл). В определенных случаях лечение антагонистами ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

В другом варианте осуществления раскрытие предусматривает способ снижения масса тела у субъекта, который имеет избыточный вес. Способ включает введение субъекту с избыточным весом эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбина-

ции таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет индекс массы тела (BMI) 25 кг/м² или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 25 кг/м² до 29,9 кг/м², от 30 кг/м² до 39,9 кг/м², от 25 кг/м² до 39,9 кг/м² или от 25 кг/м² до 50 кг/м² или от 27 до 40 кг/м². В некоторых вариантах осуществления субъект имеет ожирение. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 30 кг/м² или выше (например, от 30 до 39,9 кг/м² или от 30 кг/м² до 50 кг/м²). Антагонист ALK4:ActRIIB вводят отдельно или в виде комбинированного лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

В одном из вариантов осуществления раскрытие предусматривает способ снижения масса тела у субъекта с ожирением. Способ включает введение субъекту эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 30 кг/м² или выше (например, от 30 до 39,9 кг/м² или от 30 кг/м² до 50 кг/м²). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 40 кг/м² или выше. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет центральное ожирение (например, избыточную тучность в абдоминальной области, включая жир на животе и/или внутренний жир). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет соотношение охвата талии/бедр (WHR) 0,85 или выше. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет периферическое ожирение (например, избыточную тучность на бедрах). В некоторых вариантах осуществления лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

В другом варианте осуществления раскрытие предусматривает способ лечения и/или улучшения ожирения или заболевания или состояния, связанного с ожирением, который включает введение субъекту с ожирением эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 30 кг/м² или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 30 до 39,9 кг/м² или от 30 кг/м² до 50 кг/м². В некоторых вариантах осуществления субъект страдает патологическим ожирением. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 40 кг/м² или выше. В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет BMI от 40 кг/м² до 45 кг/м² или от 40 кг/м² до 50 кг/м². В некоторых вариантах осуществления субъект имеет сахарный диабет 2-го типа. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI 30 кг/м² или выше (например, от 30 до 39,9 кг/м²). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI по меньшей мере 40 кг/м². В некоторых вариантах осуществления субъект имеет центральное ожирение (например, избыточную тучность в абдоминальной области, включая жир на животе и/или внутренний жир). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет соотношение охвата талии/бедр (WHR) 0,85 или выше. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет периферическое ожирение (например, избыточную тучность на бедрах). В некоторых вариантах осуществления лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

Также предоставлен способ лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с ожирением, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении или предотвращении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой элемент выбранный из группы, состоящей из: дислипидемии, гиперлипидемии (уровень общего холестерина >240 мг/дл), гиперхолестеринемии (например, уровень общего холестерина >200 мг/дл, >220 мг/дл, >240 мг/дл, >250 мг/дл или >275 мг/дл), низкого уровня HDL в сыворотке (например, <40 мг/дл, <45 мг/дл или <50 мг/дл), высокого уровня LDL в сыворотке (например, ≥100 мг/дл, ≥130 мг/дл, ≥160 мг/дл или ≥190 мг/дл) и гипертриглицеридемии (например, уровень TG натощак ≥150 мг/дл, ≥175 мг/дл, ≥200 мг/дл, ≥300 мг/дл, ≥400 мг/дл или ≥499 мг/дл). В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой сердечно-сосудистое заболевание. В дополнительном варианте осуществления, заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой гипертензию (высокое кровяное давление), инфаркт миокарда, заболевания периферических артерий, нарушение функции вазорегуляции, артериосклеротическую застойную сердечную недостаточность, атеросклероз, коронарное заболевание сердца или заболевание микрососудов. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой заболевание печени. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние печени, которое лечат или предотвращают, представляет собой NAFLD. В одном из вариантов осуществления заболевание печени представляет собой жировую печень. В одном из вариантов осуществления заболевание печени представляет собой NASH. В другом варианте осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой элемент, выбранный из группы: стеатогепатит, стеатоз, фиброз и/или цирроз. В определенных случаях лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

В другом варианте осуществления раскрытие предусматривает способ лечения, улучшения и/или предотвращения сахарного диабета 2-го типа или заболевания или состояния, связанного с диабетом, включающий введение субъекту, имеющему сахарный диабет 2-го типа или риск развития диабета 2-го

типа, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет индекс массы тела BMI 30 кг/м² или выше (например, от 30 до 39,9 кг/м²). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет BMI по меньшей мере 40 кг/м². В некоторых вариантах осуществления субъект имеет центральное ожирение (например, избыточную тучность в абдоминальной области, включая жир на животе и/или внутренний жир). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет WHR 0,85 или выше. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет периферическое ожирение (например, избыточную тучность на бедрах). В некоторых вариантах осуществления лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

Также предоставлен способ лечения, улучшения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с диабетом, включающий введение субъекту, имеющему диабет, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из дислипидемии, гиперлипидемии (уровень общего холестерина >240 мг/дл), гиперхолестеринемии (например, уровень общего холестерина >200 мг/дл, >220 мг/дл, >240 мг/дл, >250 мг/дл или >275 мг/дл), низкого уровня HDL в сыворотке (например, <40 мг/дл, <45 мг/дл или <50 мг/дл), высокого уровня LDL в сыворотке (например, ≥100 мг/дл, ≥130 мг/дл, ≥160 мг/дл или ≥190 мг/дл) и гипертриглицеридемии (например, уровень TG натощак ≥150 мг/дл, ≥175 мг/дл, ≥200 мг/дл, ≥300 мг/дл, ≥400 мг/дл или ≥499 мг/дл). В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой сердечно-сосудистое заболевание. В дополнительном варианте осуществления, заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой гипертензию (высокое кровяное давление), инфаркт миокарда, заболевание периферических артерий, нарушение функции вазорегуляции или артериосклероз. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой заболевание печени. В другом варианте осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой элемент, выбранный из группы: жировое заболевание печени, стеатогепатит, стеатоз и/или цирроз. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние, которое лечат или предотвращают, представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из: катаракты, синдрома обструктивного апноэ во сне, флебита, подагры, остеоартрита, заболевания желчного пузыря и высокого холестерина. В определенных случаях лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям.

Раскрытие также предусматривает способ улучшения профиля липидов крови у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов. В некоторых вариантах осуществления раскрытие предусматривает способ снижения уровней LDL холестерина или увеличения уровней HDL холестерина. В одном из вариантов осуществления субъект имеет дислипидемию. В другом варианте осуществления субъект имеет повышенные липиды в сыворотке (например, холестерин (гиперхолестеринемия) и/или триглицериды (например, гипертриглицеридемия)). В одном из вариантов осуществления субъект имеет LDL-C ≥100 мг/дл, ≥130 мг/дл или ≥160 мг/дл). В одном из вариантов осуществления субъект имеет TG ≥150 мг/дл, ≥160 мг/дл, ≥170 мг/дл). В одном из вариантов осуществления субъект имеет повышенные уровни инсулина в плазме (гиперинсулинемия; например, уровень инсулина натощак >20 мкг/мл может превышать 100). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет II типа диабет.

В соответствии с одним из вариантов осуществления раскрытие предусматривает способ лечения или предотвращения метаболического заболевания или нарушения или состояния, связанного с метаболическим заболеванием или нарушением, который включает введение антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов, нуждающемуся в этом субъекту. В одном из вариантов осуществления метаболическое заболевание, нарушение или состояние, которое лечат, представляет собой гипергликемию (например, >130 мг/дл в состоянии натощак или после введения глюкозы во время орального теста на толерантность к глюкозе). В одном из вариантов осуществления метаболическое заболевание, нарушение или состояние, которое лечат, представляет собой заболевание, нарушение или состояние липидного метаболизма. В одном из вариантов осуществления метаболическое заболевание, нарушение или состояние, которое лечат, представляет собой дислипидемию. В дополнительном варианте осуществления заболевание, нарушение или состояние липидного метаболизма представляет собой элемент, выбранный из низких уровней HDL, высоких уровней LDL, высоких уровней триглицеридов, гиперлипидемии и отклонения липопротеинов от нормы. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень общего холестерина >200 мг/дл, >220 мг/дл, >240 мг/дл, >250 мг/дл или >275 мг/дл. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень HDL в сыворотке <40 мг/дл, <45 мг/дл или <50 мг/дл). В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень LDL в сыворотке ≥100 мг/дл, ≥130 мг/дл, ≥160 мг/дл или ≥190 мг/дл. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень TG натощак ≥150 мг/дл, ≥175 мг/дл, ≥200 мг/дл, ≥300 мг/дл, ≥400 мг/дл или ≥499 мг/дл. В одном

из вариантов осуществления метаболическое заболевание, нарушение или состояние, которое лечат, представляет собой заболевание, нарушение или состояние метаболизма глюкозы. В дополнительном варианте осуществления заболевание, нарушение или состояние метаболизма глюкозы представляет собой элемент, выбранный из: интолерантности к глюкозе, резистентности к инсулину, ослабленной толерантности к глюкозе (IGT), нарушенной глюкозы натощак (IFG). В одном из вариантов осуществления метаболическое заболевание, нарушение или состояние, которое лечат, представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из: высоких уровней мочевой кислоты, NAFLD, жировой печени, NASH и синдрома поликистоза яичников. В одном из вариантов осуществления субъект, которого лечат, имеет гиперинсулинемию. В одном из вариантов осуществления субъект, которого лечат, имеет ожирение (например, субъект имеет ожирение по абдоминальному типу). В другом варианте осуществления субъект, которого лечат, имеет диабет II типа.

Метаболический синдром представляет собой состояние, включающее группу нарушений, которое увеличивает риск заболевания сердца. Основными компонентами метаболического синдрома являются избыточная масса, параметры сердечно-сосудистой системы (высокое кровяное давление, дислипидемия, высокие уровни триглицеридов и/или низкие уровни HDL в крови), атеросклероз, диабет и/или резистентность к инсулину. Субъект, который имеет несколько из этих компонентов, т.е. метаболический синдром, сильно подвержен заболеванию сердца, хотя каждый компонент является фактором риска. Раскрытие также предусматривает способ лечения или предотвращения 1, 2, 3 или больше из приведенных выше компонентов метаболического синдрома, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов.

Дополнительно предоставлен способ лечения, предотвращения или улучшения сердечно-сосудистого заболевания или состояния, который включает введение антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов нуждающемуся в этом субъекту. В одном из вариантов осуществления сердечно-сосудистое заболевание или состояние, которое лечат, предотвращают или улучшают, представляет собой атеросклероз. В одном из вариантов осуществления сердечно-сосудистое заболевание или состояние, которое лечат, предотвращают или улучшают, представляет собой гипертензию (например, кровяное давление $>130/80$ мм рт. ст. или $>140/90$ мм рт. ст. в состоянии покоя). В одном из вариантов осуществления сердечно-сосудистое заболевание представляет собой атеросклероз (коронарное заболевание сердца).

В одном из вариантов осуществления раскрытие предусматривает способ лечения и/или улучшения воспалительного заболевания печени или состояния, который включает введение антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов, нуждающемуся в этом субъекту. В одном из вариантов осуществления заболевание или состояние представляет собой NAFLD. В дополнительном варианте осуществления заболевание или состояние представляет собой жировую печень. В дополнительном варианте осуществления заболевание или состояние представляет собой стеатоз (например, неалкогольный стеатогепатит (NASH)). В дополнительном варианте осуществления заболевание или состояние представляет собой алкогольное жировое заболевание печени.

В этом раскрытии также предусмотрен способ улучшения гликемического контроля, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB). В одном из вариантов осуществления введение осуществляют субъекту, который имеет уровень сахара в крови натощак >130 , >135 , >140 , >145 или >150 мг/дл. В одном из вариантов осуществления введение осуществляют субъекту, который имеет уровень сахара в крови после приема пищи >180 , >185 , >190 , >195 или >200 мг/дл через 2 часа после еды. В определенных случаях лечение антагонистом ALK4:ActRIIB является дополнением к диете и/или упражнениям. Введение также может снижать массу тела или лечить ожирение. В определенных случаях субъект имеет сахарный диабет 2-го типа. В определенных случаях субъект имеет BMI от 27 до 40 $\text{кг}/\text{м}^2$. В определенных случаях субъект имеет BMI от 30 до 39,9 $\text{кг}/\text{м}^2$. В определенных случаях субъект имеет BMI по меньшей мере 40. В определенных случаях субъект имеет избыточный вес. В определенных случаях субъект имеет ожирение. Улучшение гликемического контроля можно оценивать с применением известных в данной области способов, таких как тест со смешанной пищей.

Раскрытие также предусматривает композиции и способы лечения, предотвращения или улучшения гипергликемии или состояния, связанного с гипергликемией, у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB). В одном из вариантов осуществления введение осуществляют субъекту, который имеет уровень сахара в крови натощак >130 , >135 , >140 , >145 или >150 мг/дл. В одном из вариантов осуществления введение осуществляют субъекту, который имеет уровень сахара в крови после приема пищи >180 , >185 , >190 , >195 или >200 мг/дл через 2 ч после еды. В одном из вариантов осуществления результатом лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из: снижения уровней глюкозы в сыворотке, снижения уровней триглицеридов в сыворотке, снижения уровней инсулина в сыворотке и/или снижения уровней неэтерифицированных жирных кислот в сыворотке, по сравнению с уровнями в сыворотке субъекта до лечения. В

одном из вариантов осуществления результат лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности представляет собой увеличение температуры тела приблизительно от 0,4°C до 1°C по сравнению с температурой тела субъекта до лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение ALK4:ActRIIB также снижает массу тела субъекта.

В другом варианте осуществления раскрытие предусматривает способ снижения уровней инсулина в плазме у субъекта, который включает введение эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) нуждающемуся в таком лечении субъекту. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень сахара в крови натощак >130, >135, >140, >145 или >150 мг/дл. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень сахара в крови после приема пищи >180, >185, >190, >195 или >200 мг/дл через 2 ч после еды. В одном из вариантов осуществления субъект имеет избыточный вес. В одном из вариантов осуществления субъект имеет ожирение. В другом варианте осуществления субъект имеет диабет 2-го типа.

Раскрытие также предусматривает композиции и способы лечения, предотвращения или улучшения гипергликемии или состояния, связанного с гипергликемией, у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB). В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень сахара в крови натощак >130, >135, >140, >145 или >150 мг/дл. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень сахара в крови после приема пищи >180, >185, >190, >195 или >200 мг/дл через 2 ч после еды. В одном из вариантов осуществления результат лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из: снижения уровней глюкозы в сыворотке, снижения уровней триглицеридов в сыворотке, снижения уровней инсулина в сыворотке и/или снижения уровней неэтерифицированных жирных кислот в сыворотке, по сравнению с уровнями в сыворотке субъекта до лечения. В одном из вариантов осуществления результат лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности представляет собой увеличение температуры тела приблизительно от 0,4°C до 1°C по сравнению с температурой тела субъекта до лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение антагонистом ALK4:ActRIIB также снижает массу тела субъекта.

В другом варианте осуществления раскрытие предусматривает способ снижения уровней инсулина в плазме у субъекта, который включает введение эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов нуждающемуся в таком лечении субъекту. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень сахара в крови натощак >130, >135, >140, >145 или >150 мг/дл. В одном из вариантов осуществления субъект имеет уровень сахара в крови после приема пищи >180, >185, >190, >195 или >200 мг/дл через 2 ч после еды. В одном из вариантов осуществления субъект имеет избыточный вес. В одном из вариантов осуществления субъект имеет ожирение. В другом варианте осуществления субъект имеет диабет 2-го типа.

В другом варианте осуществления раскрытие предусматривает способ лечения, предотвращения или улучшения заболевания печени у субъекта, который включает введение эффективного количества антагониста ALK4:ActRIIB (например, гетеродимера ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов субъекту, имеющему заболевание печени. В одном из вариантов осуществления субъект имеет воспаление печени. В одном из вариантов осуществления субъект имеет NAFLD. В одном из вариантов осуществления субъект имеет жировую печень. В другом варианте осуществления субъект имеет NASH. В одном из вариантов осуществления субъект имеет жировую печень. В другом варианте осуществления субъект имеет алкогольное жировое заболевание печени. В одном из вариантов осуществления заболевание печени, которое лечат, предотвращают или облегчают, представляет собой фиброз, рубцевание, цирроз или печеночную недостаточность. В другом варианте осуществления заболевание печени, которое лечат, предотвращают или улучшают, представляет собой злокачественную опухоль печени. В одном из вариантов осуществления субъект имеет избыточный вес. В другом варианте осуществления субъект имеет ожирение. В другом варианте осуществления субъект имеет диабет 2-го типа.

Фиброз в целом относится к чрезмерному отложению коллагеновых волокон и внеклеточного матрикса в сочетании с относительным снижением числа клеток в органе или ткани. Несмотря на то, что этот процесс является важным признаком естественного заживления ран после повреждения, фиброз может вести патологическому повреждению в различных тканях и органах, включая, например, легкие, почки, печень, кость, мышцы и кожу. Роль TGF- β в фиброзе изучали всесторонне. Однако другие лиганды суперсемейства TGF- β также вовлечены в фиброз, включая, например, активины (например, активин A и активин B) и GDF8 [Hedger et al (2013) Cytokine and Growth Factor Reviews 24:285-295; Hardy et al. (2015) 93: 567-574; и Cantini et al. (2008) J Sex Med 5:1607-1622]. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию можно использовать для лечения фиброза, в частности, фиброз-ассоциированных нарушений и состояний. Например, антагонист ALK4:ActRIIB (например, гетеродимер ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать одно или несколько из: фиброза легких, пневмонита гиперчувствительности, идеопситического фиброза, туберкулеза, пневмонии, кистозного фиброза, астмы, хронического обструк-

тивного заболевания легких (COPD), эмфиземы, фиброза почек, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, фиброза кости, миелофиброза, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, склеродермии, саркоидоза, гранулематоза с полиангиитом, болезни Пейрони, фиброза печени, болезни Вильсона, болезни накопления гликогена (в частности III, IV, IX и X типов), перегрузки железом, болезни Гоше, синдрома Целлевегера, неалкогольного и алкогольного стеатогепатита, билиарного цирроза, склерозирующего холангита, синдрома Бадда-Киари, фиброза, ассоциированного с хирургическим вмешательством, болезни Крона, контрактуры Дюпюитрена, медиастинального фиброза, нефрогенного фиброза, ретроперитонеального фиброза, предсердного фиброза, эндомикардиального фиброза, панкреатического фиброза.

Почки поддерживают многие признаки крови, включая объем, значение pH, концентрации электролитов и кровяное давление, а также отвечают за фильтрацию токсинов и шлаков. Эти функции зависят от сложной структуры нефронов почки, постоянного потока крови через различные капилляры почки и регулирования почки с помощью сигналов от остального организма, включая эндокринные гормоны. Манифестация проблем с функцией почек просиходит с через прямые механизмы (например, генетические дефекты, инфекция или воздействие токсинов) и через не прямые механизмы, предварительно нараставшие вследствие длительных стрессовых факторов, таких как гипертрофия и гиперфильтрация (которые часто сами являются результатом более непосредственных нарушений функции почки). Из-за центральной роли почки в гомеостазе крови и секреции шлаков, манифестации заболеваний, ассоциированных с почками, являются многочисленными и различными; их обзор можно найти в *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18-е издание, McGraw Hill, N.Y., Part 13, Chp 277-289.

Как раскрыто в настоящем описании, антагонист ALK4:ActRIIB имеет различные положительные эффекты в модели заболевания почек. В частности, лечение гетеромультимером ALK4:ActRIIB снижало повреждение ткани почек, воспаление и фиброз у субъектов, имеющих одностороннюю обструкцию мочеточника. Эти данные указывают на то, что антагонисты ALK4:ActRIIB можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать почечное заболевание, в частности, лечить или предотвращать различные осложнения (манифестации) почечного заболевания, включая, например, повреждение ткани почек, воспаление и/или фиброз.

Следовательно, способы по данному изобретению можно применять при различных заболеваниях или состояниях, ассоциированных с почками. Как используют в настоящем описании, "заболевание или состояние, ассоциированное с почками" может относиться к какому-либо заболеванию, нарушению или состоянию, которое влияет на почки или почечную систему. Примеры заболеваний или состояний, ассоциированных с почками, включают, но не ограничиваясь этим, хроническую почечную недостаточность (или заболевание), острое почечное заболевание (или недостаточность), первичные почечные заболевания, не диабетические заболевания почек, гломерулонефрит, интерстициальный нефрит, диабетические заболевания почек, диабетическую нефропатию, гломерулосклероз, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, фиброз почек, синдром Альпорта, IDDM нефрит, серпангиальный пролиферативный гломерулонефрит, мембранопротиферативный гломерулонефрит, серповидный гломерулонефрит, интерстициальный фиброз почек, фокально-сегментарный гломерулосклероз, мембранозную нефропатию, болезнь минимальных изменений, слабоиммунный быстро прогрессирующий гломерулонефрит, IgA нефропатию, поликистозную болезнь почек, болезнь Дента, нефроцитиноз, нефрит Хеймана, аутосомную доминантную поликистозную болезнь почек (взрослых), аутосомную рецессивную поликистозную болезнь почек (детей), острое повреждение почек, нефротический синдром, почечную ишемию, заболевания или нарушения подоцитов, протеинурию, заболевания клубочков, мембранозный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулонефрит, предэклампсию, эклампсию, повреждения почек, заболевания коллагена сосудов, доброкачественную ортостатическую (постуральную) протеинурию, IgM нефропатию, мембранозную нефропатию, саркоидоз, сахарный диабет, повреждение почки из-за лекарственных средств, болезнь Фабри, аминокислотурию, синдром Фалькони, гипертонический нефросклероз, интерстициальный нефрит, серповидно-клеточную болезнь, гемоглобинурию, миоглобинурию, гранулематоз Вегенера, болезнь накопления гликогена I типа, хроническую почечную недостаточность, хроническое почечное заболевание, низкий уровень клубочковой фильтрации (GFR), нефроангиосклероз, волчаночный нефрит, ANCA-положительный слабоиммунный серповидный гломерулонефрит, хроническую аллотрансплантатную нефропатию, нефротоксичность, почечную токсичность, некроз почки, повреждение почки, повреждение клубочков и канальцев, нарушение функции почек, нефритический синдром, острую почечную недостаточность, хроническую почечную недостаточность, нарушение функции проксимальных канальцев, острое отторжение трансплантата почки, хроническое отторжение трансплантата почки, не IgA мезангиопротиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит, васкулиты с вовлечением почек какого-либо типа, какое-либо наследственное почечное заболевание, какой-либо интерстициальный нефрит, недостаточность трансплантата почки, злокачественную опухоль почки, почечное заболевание, связанное с другими состояниями (например, гипертонией, диабетом и аутоиммунным заболеванием), болезнь Дента, нефроцитиноз, нефрит Хеймана, первичное почечное заболевание, коллапсирующую гломерулонию, болезнь плотного осадка, гломерулонефрит, ассоциированный с криоглобулинемией, болезнь Геноха-Шонлейна, постинфекционный гломерулонефрит, бактериальный эндо-

кардит, микроскопический полиангиит, синдром Черджа-Строса, гломерулонефрит, опосредованный антителами против GBM, амилоидоз, болезнь отложения моноклональных иммуноглобулинов, фибриллярный гломерулонефрит, иммунотактоидную гломерулопатию, ишемическое повреждение канальцев, индуцированный медикаментозным лечением канальцево-интерстициальный нефрит, токсический канальцево-интерстициальный нефрит, инфекционный канальцево-интерстициальный нефрит, бактериальный пиелонефрит, вирусный инфекционный канальцево-интерстициальный нефрит, который является результатом полиомавирусной инфекции или ВИЧ-инфекции, метаболически индуцированное канальцево-интерстициальное заболевание, смешанное заболевание соединительной ткани, канальцевую нефропатию, кристаллическую нефропатию, которая может быть результатом отложения кристаллов, вызванного уратами или оксалатами или лекарственными средствами, острое клеточное отторжение канальцево-интерстициального аллотрансплантата, опухолевую инфильтрационную болезнь, которая является результатом лимфомы или посттрансплантационного лимфолифферативного заболевания, обструктивное заболевание почек, заболевание сосудов, тромботическую микроангиопатию, нефроангиосклероз, атероземболическую болезнь, смешанное заболевание соединительной ткани, узелковый полиартериит, индуцированное ингибитором кальциневрина заболевание сосудов, острое клеточное отторжение сосудистого аллотрансплантата, острое гуморальное отторжение аллотрансплантата, раннее снижение функции почек (ERFD), терминальное почечное заболевание (ESRD), тромбоз почечных вен, острый канальцевый некроз, острый интерстициальный нефрит, устоявшуюся хроническую почечную недостаточность, стеноз почечной артерии, ишемическую нефропатию, уремию, индуцированный лекарственным средством и токсином хронический тубулоинтерстициальный нефрит, рефлюксную нефропатию, камни в почках, синдром Гудпасчера, нормоцитарную нормохромную анемию, почечную анемию, диабетическую хроническую почечную недостаточность, заболевание, связанное с IgG4, синдром фон Гиппеля-Линдау, туберозный склероз, нефронофтиз, мозговое кистозное почечное заболевание, почечноклеточную карциному, аденокарциному, нефробластому, лимфому, лейкоз, нарушение гипосиалирования, хроническую циклоспориновую нефропатию, реперфузионное повреждение почек, дисплазию почек, азотемию, билатеральную закупорку артерий, острую мочекислую нефропатию, гиповолемию, острую билатеральную обструктивную уропатию, гиперкальцемическую нефропатию, гемолитический уремический синдром, острую задержку мочи, озлокачествленный нефросклероз, послеродовой гломерулосклероз, склеродермию, болезнь антител против GBM, не являющееся синдромом Гудпасчера, микроскопический узелковый полиартериит, аллергический гранулематоз, острый лучевой нефрит, постстрептококковый гломерулонефрит, макроглобулинемию Вальденстрема, анальгезическую нефропатию, артериовенозную фистулу, артериовенозный трансплантат, диализ, эктопическую почку, спонгиозную почку, нефрогенную остеодистрофию, единственную почку, гидронефроз, макроальбуминурию, уремию, гематурию, гиперлипидемию, гипоальбуминемию, липидурию, ацидоз, гиперкалиемию и отек.

В некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию (например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, такие как гетеродимер ALK4:ActRIIB) можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать хроническую почечную недостаточность, необязательно в комбинации с одной или несколькими поддерживающими терапиями для лечения хронической почечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию (например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, такие как гетеродимер ALK4:ActRIIB) можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать одно или несколько осложнений (симптомы или манифестацию) хронической почечной недостаточности, необязательно в комбинации с одной или несколькими поддерживающими терапиями для лечения хронической почечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления антагонист ALK4:ActRIIB или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию (например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB, такие как гетеродимер ALK4:ActRIIB) можно использовать для того, чтобы лечить или предотвращать терминальную стадию почечной недостаточности, необязательно в комбинации с одной или несколькими поддерживающими терапиями для лечения терминальной стадии почечного заболевания. Хроническая почечная недостаточность (СКД), также известная как хроническое почечное заболевание, представляет собой нарастающую потерю функции почек в течение периода в месяцы или годы. Симптомы ухудшения функции почек могут включать в целом неудовлетворительное самочувствие и сниженный аппетит. Часто хроническую почечную недостаточность диагностируют в результате скрининга людей, о которых известно, что они имеют риск проблем с почками, таких как те, которые имеют высокое кровяное давление или диабет, и тех, которые имеют кровных родственников с СКД. Это заболевание также можно идентифицировать, когда оно ведет к одному из общепризнанных осложнений, таких как сердечно-сосудистое заболевание, анемия или перикардит. В недавних профессиональных руководствах СКД классифицируют по пяти стадиям тяжести, где стадия 1 является самой мягкой и обычно вызывает некоторые симптомы, а стадия 5 представляет собой тяжелое заболевание с низкой ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения. Стадия 5 СКД часто называют терминальной стадией почечного заболевания или терминальной стадией почечной недостаточности, и в целом она является синонимом теперь устаревшего термина хроническая почечная недостаточность; и обычно она обозначает пациента, которому необходима заместительная почечная терапия, которая мо-

жет включать определенную форму диализа, но в идеале представляет собой трансплантат почки. СКД изначально не имеет специфических симптомов, и в целом ее обнаруживают только с увеличением креатинина в сыворотке или белка в моче. По мере снижения функции почек может происходить манифестация симптомов, как описано ниже. Кровяное давление может возрасти из-за гиперволемии и образования вазоактивных гормонов почек через ренин-ангиотензиновую систему, что увеличивает риск развития гипертензии и/или застойной сердечной недостаточности. Может происходить накопление мочевины, ведущее к азотемии и, в конечном итоге, уремии (симптомами в диапазоне от летаргии до перикардита и энцефалопатии). Из-за высокого содержания в системной циркуляции, происходит экзокринная экскреция мочевины с потом в высоких концентрациях и кристаллизация на коже по мере испарения пота ("уремический иней"). В крови может происходить накопление калия (гиперкалиемия с определенным спектром симптомов, включая тревогу и потенциально фатальные сердечные аритмии). Гиперкалиемия обычно не развивается до тех пор, пока уровень клубочковой фильтрации не упадет ниже 20-25 мл/мин/1,73 м², в этой точке почки имеют сниженную способность выводить калий. Гиперкалиемия при СКД может быть осложнена ацидезией (которая ведет к внеклеточному сдвигу калия) и недостатком инсулина. Может происходить снижение синтеза эритропоэтина, вызывающее анемию. Симптомы гиперволемии могут возникать в диапазоне от легкого отека до отека легких, угрожающего жизни. Гиперфосфатемия, из-за сниженной экскреции фосфатов, может возникать в целом после снижения клубочковой фильтрации. Гиперфосфатемия связана с увеличенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, являясь прямым стимулом для кальцификации сосудов. Может происходить манифестация гипокальциемии, которая в целом обусловлена стимуляцией фактора роста фибробластов 23. Остеоциты отвечают за увеличенное продуцирование FGF23, который является мощным ингибитором фермента 1- α -гидроксилазы (отвечающего за превращение 25-гидроксиколекальциферола в 1,25 дигидроксивитамин D3). Позднее это прогрессирует во вторичный гиперпаратиреозидизм, нефрогенную остеодистрофию и кальцификацию сосудов, которая дополнительно ослабляет функцию сердца. Может возникать метаболический ацидоз (из-за накопления сульфатов, фосфатов, мочевой кислоты и т.д.), который является причиной измененной активности ферментов из-за избытка кислоты, действующей на ферменты; а также повышенной возбудимости мембран сердца и нейронов за счет развития гиперкалиемии из-за избыточной кислоты (ацидемии). Ацидоз также обусловлен сниженной способностью создавать достаточно аммиака из клеток проксимальных канальцев. Железодефицитная анемия, распространенность которой возрастает со снижением функции почек, в частности, преобладает у тех, кто нуждается в гемодиализе. Причины этого являются многофакторными, но включают увеличенное воспаление, снижение эритропоэтина и гиперурикемию, ведущие к супрессии костного мозга. Люди с СКД страдают от ускоренного атеросклероза и с большей вероятностью подвержены сердечно-сосудистым заболеваниям, чем общая популяция. Пациенты, страдающие СКД и сердечно-сосудистыми заболеваниями, обычно имеют значительно более плохие прогнозы, чем те, которые страдают только последними.

Как используют в настоящем описании, "в комбинации с", "комбинации" или "совместное введение" относится к какой-либо форме введения так, что дополнительная терапия (например, вторая, третья, четвертая и т.д.) все еще эффективна в организме (например, у пациента эффективны одновременно несколько соединений, что может включать синергические эффекты этих соединений). Эффективность может не коррелировать с поддающейся измерению концентрацией средства в крови, сыворотке или плазме. Например, различные терапевтические соединения можно вводить или в одном и том же составе или в отдельных составах, или параллельно или последовательно, и по различным схемам. Таким образом, индивидуум, который получает такое лечение, может выигрывать от комбинированного эффекта различных терапий. Один или несколько антагонистов ALK4:ActRIIB по раскрытию можно вводить одновременно с, перед или после одного или нескольких других дополнительных средств или поддерживающих терапий. В целом, каждое терапевтическое средство вводят в дозе и/или по расписанию, которые определяют для этого конкретного средства. Конкретная комбинация для использования в схеме должна учитывать совместимость антагониста по настоящему раскрытию с терапией и/или желаемым.

7. Фармацевтические композиции.

В определенных аспектах антагонисты ALK4:ActRIIB (например, гетеромультимеры ALK4:ActRIIB) или комбинации таких антагонистов по настоящему раскрытию можно вводить отдельно или в виде компонента фармацевтического состава (также обозначаемого как терапевтическая композиция или фармацевтическая композиция). Фармацевтический состав относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы допускать эффективную биологическую активность активного ингредиента (например, средства по настоящему раскрытию), содержащегося в нем, и который не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсическими для субъекта, которому вводят состав.

Рассматриваемые соединения можно формулировать для введения каким-либо удобным образом для использования у человека или в ветеринарии. Например, одно или несколько средств по настоящему раскрытию можно формулировать с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемый носитель относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который в целом является нетоксическим для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель

включает, но не ограничиваясь этим, буфер, эксципиент, стабилизатор и/или консервант. В целом, фармацевтические составы для использования в настоящем раскрытии представляют собой не содержащую пирогенов физиологически приемлемую форму, когда ее вводят субъекту. Терапевтически эффективные средства, отличные от описанных в настоящем описании, которые необязательно можно включать в состав, как описано выше, можно вводить в комбинации с рассматриваемыми средствами в способах по настоящему раскрытию.

В определенных вариантах осуществления композиции вводят парентерально [например, посредством внутривенной (I.V.) инъекции, внутриартериальной инъекции, внутрикостной инъекции, внутримышечной инъекции, интратекальной инъекции, подкожной инъекции или внутрикожной инъекции]. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать одно или несколько средств по раскрытию в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые можно восстанавливать в стерильные инъекционные растворы или дисперсии перед использованием. Инъекционные растворы или дисперсии могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, суспендирующие средства, загустители или растворенные вещества, которые делают состав изотоничным крови предполагаемого реципиента. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических составах по настоящему раскрытию, включают воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.д.), растительные масла (например, оливковое масло), инъекционные органические сложные эфиры (например, этилолеат) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством покрывающих материалов (например, лецитина), посредством поддержания необходимого размера частицы в случае дисперсий и с помощью поверхностно-активных средств.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический способ по настоящему раскрытию включает введение фармацевтической композиции системно или локально, из импланта или устройства. Кроме того, фармацевтическая композиция может быть инкапсулированной или инъекционной в форме для доставки в целевое место в ткани (например, в костный мозг или мышцу). В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему раскрытию могут содержать матрицу, способную доставлять одно или несколько из средств по настоящему раскрытию в целевое место в ткани (например, костный мозг или мышцу), предоставляющую структуру для развития ткани и оптимально способную к резорбции в организме. Например, матрица может обеспечивать медленное высвобождение одного или нескольких средств по настоящему раскрытию. Такие матрицы можно формировать из материалов, в настоящее время используемых для других имплантируемых медицинских применений.

Выбор материала матрицы может быть основан на одном или нескольких из: биосовместимости, способности к биологическому разрушению, механических свойств, косметического внешнего вида и свойств в области контакта. Конкретное применение рассматриваемых композиций будет определять подходящий состав. Потенциальные матрицы для композиций могут представлять собой биоразрушаемый и химически определенный сульфат кальция, трикальцийфосфат, гидроксиапатит, полимолочную кислоту и полиангидриды. Другие потенциальные материалы являются биоразрушаемыми и биологически четко определенными, включая, например, кость или кожный коллаген. Дополнительные матрицы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие потенциальные матрицы являются не биоразрушаемыми и химически определенными, включая, например, синтерированный гидроксиапатит, биостекло, алюминаты или другую керамику. Матрицы могут состоять из комбинаций материалов любых указанных выше типов, включая, например, полимолочную кислоту и гидроксиапатит или коллаген и трикальцийфосфат. Биокерамику можно изменять по композиции (например, кальций-алюминат-фосфат) и обрабатывать для изменения одного или нескольких из размера пор, размера частиц, геометрической формы частиц и способности к биологическому разрушению.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему раскрытию можно вводить топически. "Топическое применение" или "топически" обозначает контакт фармацевтической композиции с поверхностями организма, включая, например, кожу, места ран и слизистые оболочки. Топические фармацевтические композиции могут иметь различные формы применения и обычно содержат слой, содержащий лекарственное средство, который адаптируют для размещения около или в непосредственном контакте с тканью при топическом введении композиции. Фармацевтические композиции, подходящие для топического введения, могут содержать один или несколько антагонистов ALK4:ActRIIB по раскрытию в комбинации, сформулированной в виде 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 применять посредством размазывания, распыления, намазывания, нанесения мазков или катания композиции на целевой ткани. Композициями также можно импрегнировать стерильные повязки, трансдермальные пластыри, гипс и бинты. Композиции в форме мастики, полутвердого или твердого вещества могут быть деформируемыми. Они могут быть эластическими или не эластическими (например, гибкими или жесткими). В определенных аспектах композиция формирует часть композита и может включать волокна, твердые частицы или несколько

слоев в одинаковой или различными композициями.

Топические композиции 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, широко используемый в данной области, включая, например, воду, или другой растворитель, солюбилизующее средство и/или эмульсификатор [например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль или 1,3-бутиленгликоль, масло (например, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое масло, масло клещевины и сезамовое масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоль, сложный эфир жирной кислоты и сорбитана и их смеси].

Композиции топических гелей, кремов, лосьонов, мазей, полутвердых или твердых веществ могут включать один или несколько загустителей, таких как полисахарид, синтетический полимер или полимер на белковой основе. В одном из вариантов осуществления изобретения гелеобразующее средство в настоящем описании представляет собой то, которое подходящим образом является нетоксическим и дает желаемую вязкость. Загустители могут включать полимеры, сополимеры и мономеры следующего: винилпирролидонов, метакриламидов, акриламидов N-винилимидазолов, карбоксивинилов, сложных виниловых эфиров, простых виниловых эфиров, силиконов, полиэтиленоксидов, полиэтиленгликолей, винилового спирта, акрилатов натрия, акрилатов, малеиновой кислоты, NN-диметилакриламида, диацетонакриламида, акриламида, акрилоилморфолина, Pluronic, коллагенов, полиакриламидов, полиакрилатов, поливиниловых спиртов, поливиниленов, поливинилсиликатов, полиакрилатов, замещенных сахарами (например, сахарозой, глюкозой, глюкозаминами, галактозой, трегалозой, маннозой или лактозой), ациламинопропансульфоновой кислоты, тетраметоксиортосиликатов, метилтриметоксиортосиликатов, тетраалкоксиортосиликатов, триалкоксиортосиликатов, гликолей, пропиленгликоля, глицерина, полисахаридов, альгинатов, декстранов, циклодекстрина, целлюлозы, модифицированной целлюлозы, окисленной целлюлозы, хитозана, хитина, гуара, каррагенанов, гиалуроновой кислоты, инулина, крахмала, модифицированного крахмала, агарозы, метилцеллюлозы, растительных смол, гиалуронана, гидрогелей, желатинов, гликозаминогликанов, карбоксиметилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, пектина, пектинов с низким содержанием метоксигрупп, сшитых декстранов, крахмал-акрилонитриловых привитых сополимеров, полиакрилата крахмала натрия, гидроксипропилметакрилатов, гидроксипропилметакрилатов, поливинилена, простых полиэтиловиниловых эфиров, полиметилметакрилатов, полистиролов, полиуретанов, полиалканоатов, полимолочной кислоты, полилактатов, поли(3-гидроксибутирата), сульфонированных гидрогелей, AMPS (2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой кислоты), SEM (сульфоэтилметакрилата), SPM (сульфопропилметакрилата), SPA (сульфопропилакрилата), N,N-диметил-N-метакрилоксиэтил-N-(3-сульфопропил)аммоний бетаина, метакриловой кислоты амидопропилдиметиламмоний сульфобетаина, SPI (сложный эфир итаконовой кислоты-бис(1-пропилсульфоновой кислоты-3) соли дикалия), итаконовых кислот, AMBC (3-акриламидо-3-метилбутановой кислоты), β -карбоксиэтилакрилата (димеров акриловой кислоты) и полимеров простого эфира малеинового ангидрида-метилвинила, их производных, их солей, их кислот и их сочетаний. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему раскрытию можно вводить перорально, например, в форме капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, пастилок (используя ароматизированную основу, такую как сахароза и гуммиарабик или трагакант), порошков, гранул, раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле или крепкого настоя или сиропа или лепешки (используя инертную основу, такую как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик), и/или полоскания полости рта, каждое содержит предварительно определяемое количество соединения по настоящему раскрытию и необязательно один или несколько других активных ингредиентов. Соединение по настоящему раскрытию и необязательно один или несколько других активных ингредиентов также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

В твердых дозированных формах для перорального введения (например, капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках и гранулах) одно или несколько соединений по настоящему раскрытию можно смешивать с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, включая, например, цитрат натрия, фосфат дикальция, наполнитель или разбавитель (например, крахмал, лактозу, сахарозу, глюкозу, маннит и кремниевую кислоту), связывающее средство (например, карбоксиметилцеллюлозу, альгинат, желатин, поливинилпирролидон, сахарозу и гуммиарабик), увлажнитель (например, глицерин), средство для улучшения распадаемости (например, агар-агар, карбонат кальция, крахмал из картофеля или тапиоки, альгиновую кислоту, силикат и карбонат натрия), задерживающее растворение средство (например, парафин), ускоритель абсорбции (например, соединение четвертичного аммония), увлажняющее средство (например, цетиловый спирт и глицерина моностеарат), абсорбент (например, каолиновую и бентонитовую глину), смазывающее средство (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 средство. Твердые композиции схожего типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых наполненных желатиновых капсулах с использованием одного или нескольких эксципиентов, включая, например, лактозу или молочный сахар, а также высокомолекулярный полиэтиленгликоль.

Жидкие дозированные формы для перорального введения фармацевтической композиции могут включать фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и крепкие настои. В дополнение к активному ингредиенту(ам), жидкая дозированная форма может содержать инертный разбавитель, широко используемый в данной области, включая, например, воду или другой растворитель, солюбилизующее средство и/или эмульсификатор [например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль или 1,3-бутиленгликоль, масло (например, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое масло, масло клещевины и сезамовое масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоль, сложный эфир жирной кислоты и сорбитана и их смеси]. Помимо инертных разбавителей, оральная форма также может содержать адьювант, включая, например, увлажняющее средство, эмульгирующее и суспендирующее средство, подсластитель, ароматизатор, краситель, ароматическое средство, консервант и их сочетания.

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

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

В определенных вариантах осуществления может быть желательно включать в композиции изотоническое средство, включая, например, сахар или хлорид натрия. Кроме того, пролонгированную абсорбцию инъекционной фармацевтической формы можно осуществлять посредством включения средства, которое задерживает абсорбцию, включая, например, моностеарат алюминия и желатин.

Понятно, что схему дозирования определяет лечащий врач с учетом различных факторов, которые модифицируют действие одного или нескольких средств по настоящему раскрытию. В случае антагониста ALK4:ActRIIB, который содействует образованию красных клеток крови, различные факторы могут включать, но не ограничиваясь этим, число красных клеток крови пациента, уровень гемоглобина, желаемое целевое число красных клеток крови, возраст пациента, пол пациента, диету пациента, тяжесть какого-либо заболевания, которое может вносить вклад в пониженный уровень красных клеток крови, время введения и другие клинические факторы. Добавление других известных активных средств в конечную композицию также может влиять на дозу. Можно осуществлять мониторинг прогресса посредством периодической оценки одного или нескольких из уровней красных клеток крови, уровней гемоглобина, уровней ретикулоцитов и других показателей процесса гематопозеза.

В определенных вариантах осуществления настоящее раскрытие также предусматривает генную терапию для продуцирования одного или нескольких средств по настоящему раскрытию *in vivo*. Такая терапия будет достигать своего терапевтического эффекта посредством введения последовательностей средства в клетки или ткани, имеющие одно или несколько из нарушений, перечисленных выше. Доставка последовательностей средства можно достичь, например, с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, такого как химерный вирус или коллоидная дисперсионная система. Предпочтительная терапевтическая доставка одной или нескольких из последовательностей средства по раскрытию состоит в использовании направленных липосом.

Различные вирусные векторы, которые можно использовать для генной терапии, как сказано 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 можно вставлять один чужеродный ген, включают, но не ограничиваясь этим: вирус лейкоза мышей Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочных желез мышей (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Многие дополнительные ретровирусные векторы могут содержать множество генов. Все эти векторы могут переносить или содержать ген для селективного маркера с тем, чтобы можно было создавать и идентифицировать трансдуцированные клетки. Можно создавать ретровирусные векторы с конкретными мишенями посредством прикрепления, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание выполняют с использованием антитела. Специалистам в данной области понятно, что специфические полинуклеотидные последовательности можно вставлять в ретровирусный геном или прикреплять к вирусной оболочке для того, чтобы сделать возможным направленную специфическую доставку ретровирусного вектора, содержащего одно или несколько средств по настоящему раскрытию.

Альтернативно, клетки тканевой культуры можно трансфицировать непосредственно плазмидами, кодирующими ретровирусные структурные гены (*gag*, *pol* и *env*), посредством стандартной трансфекции с фосфатом кальция. Затем эти клетки трансфицируют векторной плазмидой, содержащей гены, представляющие интерес. Получаемые клетки высвобождают ретровирусный вектор в среду для культивирования.

Другой направленной системой доставки для одного или нескольких средств по настоящему раскрытию является коллоидная дисперсная система. Коллоидные дисперсные системы включают, напри-

мер, макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии "масло-вводе", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. В определенных вариантах осуществления предпочтительной коллоидной системой по этому раскрытию является липосома. Липосомы представляют собой везикулы из искусственных мембран, которые можно использовать в качестве носителей для доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы можно инкапсулировать в водной внутренней части и доставлять в клетки в биологически активной форме [Fraleley, et al. (1981) Trends Biochem. Sci., 6:77]. Способы эффективного переноса генов с использованием липосомного носителя известны в данной области [Mannino, et al. (1988) Biomethods, 6:682, 1988].

Композиция липосом 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, фосфатидиловые соединения (например, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, сфинголипид, цереброзид и ганглиозид), яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Нацеливание липосом также возможно на основании, например, органной специфичности, клеточной специфичности и органеллоспецифичности, и известно в данной области.

Включение по ссылке

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, включены, таким образом, посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждую индивидуальную публикацию или патент указывали конкретно и индивидуально для включения по ссылке.

Хотя рассмотрены конкретные варианты осуществления объекта изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным и не ограничивающим. Многие вариации будут видны специалистам в данной области при рассмотрении этого описания и формулы изобретения, приведенной далее. Полный объем изобретения определяют, обращаясь к формуле изобретения, наряду с ее полным объемом эквивалентов и описанием, наряду с такими вариациями.

Примеры

Изобретение, теперь описанное в целом, будет легче понять, обратившись к следующим примерами, которые включены лишь в целях иллюстрации определенных вариантов осуществления и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Создание гетеродимера ALK4:ActRIIB.

Заявители конструировали растворимый гетеромерный комплекс ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, который содержит 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 обозначают как слитый полипептид ActRIIB-Fc и слитый полипептид ALK4-Fc, соответственно, и последовательности для каждого предоставлены далее.

Способ содействия формированию гетеромерных комплексов ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, в противоположность гомодимерным комплексам ActRIIB-Fc или ALK4-Fc, состоит во введении изменений в аминокислотную последовательность Fc-доменов для того, чтобы направлять формирование асимметричных гетеромерных комплексов. Многие различные подходы к созданию асимметричных взаимодействующих пар с использованием Fc-доменов описаны в этом раскрытии.

В одном подходе, проиллюстрированном в полипептидных последовательностях ActRIIB-Fc и ALK4-Fc из SEQ ID №№ 39-41 и 42-44, соответственно, один Fc-домен изменяют для того, чтобы вводить катионные аминокислоты на поверхности взаимодействия, тогда как другой Fc-домен изменяют для того, чтобы вводить анионные аминокислоты на поверхности взаимодействия. В каждом из слитого полипептида ActRIIB-Fc и слитого полипептида ALK4-Fc используют лидер тканевого активатора плазминогена (TPA):

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID № 38) .

Полипептидная последовательность ActRIIB-Fc (SEQ ID № 39) приведена далее:

```
1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNNHTQK SLSLSPGK (SEQ ID № 39)
```

Лидерная (сигнальная) последовательность и линкер подчеркнуты. Для того чтобы содействовать формированию гетеродимера ALK4-Fc:ActRIIB-Fc вместо любого из возможных гомодимерных комплексов, две замены аминокислот (замены кислых аминокислот на лизин) можно вводить в Fc-домен

слитого белка ActRIIB, как показано выше с помощью двойного подчеркивания. Можно необязательно предоставлять аминокислотную последовательность из SEQ ID № 39 с лизином (K), удаленным с С-конца.

Этот слитый белок ActRIIB-Fc кодирует следующая последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID № 40):

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GTCCTGAAG AAGGGCTGCT
251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
301 GAGAACCCCC AGGTGTA CTTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
401 CACCCCGGAC AGCCCGACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCTT TCCCCCAAA
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG
851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
951 CGTGTGAAG TCCGACGGCT CTTTCTTCTT СТАТАGCAAG CTCACCGTGG
1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101 TAAA (SEQ ID № 40)

```

Зрелый слитый полипептид ActRIIB-Fc (SEQ ID № 41) представляет собой следующее, и необязательно может быть предоставлен с лизином (K), удаленным с С-конца.

```

1 GRGEAETREC IYNNANWELE 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 EPQVYTLPPS
251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSL PGK
(SEQ ID № 41)

```

Комплементарная форма слитого полипептида ALK4-Fc (SEQ ID № 42) представляет собой следующее:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51 GACMVSIFNL DGMENHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY
301 DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPG (SEQ ID № 42)

```

Лидерная последовательность и линкер подчеркнуты. Для того чтобы направлять формирование гетеродимера со слитым полипептидом ActRIIB-Fc из SEQ ID №№ 39 и 41, выше, две замены аминокислот

(заменяющие лизин на аспарагиновую кислоту) можно вводить в Fc-домен слитого полипептида ALK4-Fc, как показано двойным подчеркиванием, выше. Аминокислотную последовательность из SEQ ID № 42 необязательно можно предоставлять с лизином (K), добавленным на C-конце.

Этот слитый белок ALK4-Fc кодирует следующая нуклеиновая кислота (SEQ ID № 43):

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA АСТАСАСGТG TGAGACAGAT
151 GGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
201 GCGCACCTGC ATCCCCAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
251 АСТGССТGAG STCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
301 ТАСТGСААСА GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAАСТСАСА
401 САТGСССАСС GTGСССАСGА ССТGААСТСС TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
451 СТСТТССССС СААААСССАА GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCTGA
501 GGTСАСАТGС GTGGTGGTGG АСГТGAGССА СGААGACCCT GAGGTCAAGT
551 ТСААСТGGТА СGTGGACGGC GTGGAGGTGC АТААТGССАА GАСААAGССG
601 СGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCCT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
701 АСААAGСССТ СССAGССССС АТСGAGАААА ССАТСТССАА AGCCAAAGGG
751 СAGССССGAG ААССАСAGGT GTACACCCTG СССССАТССС GGGAGGAGAT
801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
901 GACACCACGC STCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
951 СGACСТСАСС GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC АСТАСАСGСА GAAGAGCCTC
1051 ТСССТGTCTC CGGGT (SEQ ID № 43)

```

Последовательность зрелого слитого белка ALK4-Fc (SEQ ID № 44) представляет собой следующее и необязательно может быть предоставлена с лизином (K), добавленным на C-конце.

```

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
101 PVETGGGTHT CPPCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTP PVLDSGGSFF LYSDLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID № 44)

```

Белки ActRIIB-Fc и ALK4-Fc из SEQ ID № 41 и SEQ ID № 44, соответственно, можно совместно экспрессировать и выделять из клеточной линии CHO, чтобы давать начало гетеромерному комплексу, который содержит ALK4-Fc:ActRIIB-Fc.

В другом подходе, чтобы содействовать формированию гетеромультимерных комплексов с использованием асимметричных Fc слитых белков, Fc-домены изменяют для того, чтобы вводить комплементарные гидрофобные взаимодействия и дополнительную межмолекулярную дисульфидную связь, как проиллюстрировано в полипептидных последовательностях ActRIIB-Fc и ALK4-Fc из SEQ ID №№ 45-46 и 47-48, соответственно. В каждом из слитого полипептида ActRIIB-Fc и слитого полипептида ALK4-Fc используют лидер тканевого активатора плазминогена (TPA):

```
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID № 38) .
```

Полипептидная последовательность ActRIIB-Fc (SEQ ID № 45) приведена далее:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGTHTCPPC
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID № 45)

Лидерная (сигнальная) последовательность и линкер подчеркнуты. Для того чтобы содействовать формированию гетеродимера ALK4-Fc:ActRIIB-Fc вместо любого из возможных гомодимерных комплексов, две замены аминокислот (заменяющие серии на цистеин и треонин на триптофан) можно вводить в Fc-домен слитого белка, как показано двойным подчеркиванием, выше. Аминокислотную последовательность из SEQ ID № 45 необязательно можно предоставлять с лизином (K), удаленным с С-конца.

Зрелый слитый полипептид ActRIIB-Fc представляет собой следующее:

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151 RTPEVTCVVV DVSHEDEPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
 251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PVLDSGDSF
 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID № 46)

Комплементарная форма слитого полипептида ALK4-Fc (SEQ ID № 47) представляет собой следующее и необязательно может быть предоставлена с лизином (K), удаленным с С-конца.

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
 51 GACMVSIFNL DGMENHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 301 KTTTPVLDSG DSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPGK (SEQ ID № 47)

Лидерная последовательность и линкер подчеркнуты. Для того чтобы направлять формирование гетеродимера со слитым полипептидом ActRIIB-Fc из SEQ ID №№ 45 и 46, выше, четыре замены аминокислот можно вводить в Fc-домен слитого полипептида ALK4, как показано двойным подчеркиванием, выше. Аминокислотную последовательность из SEQ ID № 47 необязательно можно предоставлять с лизином (K), удаленным с С-конца.

Последовательность зрелого слитого белка ALK4-FC представляет собой следующее и необязательно может быть предоставлена с лизином (K), удаленным с С-конца.

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
 101 PVETGGGTHT CPPCPAPEL LGGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
 251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PVLDSGDSFF LVSKLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID № 48)

Белки ActRIIB-Fc и ALK4-FC из SEQ ID № 46 и SEQ ID № 48, соответственно, можно совместно экспрессировать и выделять из клеточной линии CHO, чтобы давать начало гетеромерному комплексу, который содержит ALK4-Fc:ActRIIB-Fc.

Очистку различных комплексов ALK4-Fc:ActRIIB-Fc можно осуществлять посредством ряда ста-

дий колоночной хроматографии, включая, например, три или больше из следующего, в любом порядке: хроматография на белке А, хроматография на сефарозе Q, хроматография на фенолсефарозе, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать вирусным фильтрованием и заменой буфера.

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

Анализ связывания на основе Biacore™ использовали для того, чтобы сравнивать избирательность связывания лигандов гетеродимерным комплексом ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, описанным выше, с таковой у гомодимерных комплексов ActRIIB-Fc и ALK4-Fc. Гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, гомодимер ActRIIB-Fc и гомодимер ALK4-Fc независимо захватывали в системе, используя антитело против Fc. Лиганды инъецировали и оставляли течь поверх захваченного рецепторного белка. Результаты сведены в таблице ниже, где скорости диссоциации лигандов (k_d), наиболее показательные для эффективных ловушек для лигандов, отмечены серым затенением.

Профиль связывания лигандов гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc и гомодимером ALK4-Fc									
Лиганд	Гомодимер ActRIIB-Fc			Гомодимер ALK4-Fc			Гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-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	$1,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^{-4}$	19	$5,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-2}$	20000	$1,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^{-4}$	12
Активин В	$5,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-4}$	20	Нет связывания			$7,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^{-5}$	6
BMP6	$3,2 \times 10^7$	$6,8 \times 10^{-3}$	190	---			$2,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^{-3}$	2700
BMP9	$1,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{-3}$	77	---			Временное		3400
BMP10	$2,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^{-4}$	11	---			$5,6 \times 10^7$	$4,1 \times 10^{-3}$	74
GDF3	$1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	1500	---			$3,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{-2}$	4900
GDF8	$8,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$	280	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-3}$	15000	$3,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-4}$	550
GDF11	$5,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{-4}$	2	$5,0 \times 10^6$	$4,8 \times 10^{-3}$	270†	$3,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{-4}$	3

* Не поддается определению из-за временной природы взаимодействия.

† Очень слабый сигнал.

--- Не тестировали.

Эти сравнительные данные о связывании показывают, что гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc имеет измененный профиль связывания/избирательность относительно любого из гомодимеров ActRIIB-Fc или ALK4-Fc. Гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc демонстрирует усиленное связывание с активинном В по сравнению с любым гомодимером, сохраняет сильное связывание с активинном А, GDF8 и GDF11, как наблюдали с использованием гомодимера ActRIIB-Fc, и демонстрирует по существу сниженное связывание с BMP9, BMP10 и GDF3. В частности, BMP9 демонстрирует низкую или не наблюдаемую аффинность к гетеродимеру ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, тогда как этот лиганд прочно связывается с гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc. Подобно гомодимеру ActRIIB-Fc, гетеродимер сохраняет промежуточный уровень связывания с BMP6. См. фиг. 6.

Кроме того, анализ репортерного гена A-204 использовали для того, чтобы оценивать эффекты гетеродимера ALK4-Fc:ActRIIB-Fc и гомодимера ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc, оказываемые на передачу сигнала посредством активина А, активина В, GDF11, GDF8, BMP10 и BMP9. Клеточная линия: рабдомиосаркома человека (получена из мышцы). Репортерный вектор: pGL3(CAGA)12 (как описано в Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). Мотив CAGA12 присутствует в TGF- β чувствительных генах (ген PAI-1), так что этот вектор имеет общее использование для факторов, передающих сигнал через Smad2 и 3. Образцовый анализ репортерного гена A-204 описан далее.

Сутки 1: клетки A-204 распределяют по 48-луночному планшету.

Сутки 2: клетки A-204 трансфицируют с использованием 10 мкг pGL3(CAGA)12 или pGL3(CAGA)12(10 мкг)+pRLCMV (1 мкг) и Fugene.

Сутки 3: добавляют факторы (разведенные в среде+0,1% BSA). Ингибиторы нужно предварительно

инкубировать с факторами в течение приблизительно одного часа перед добавлением к клеткам. Приблизительно через 6 часов, клетки споласкивают в PBS и затем лизируют.

Придерживаясь вышеприведенных стадий, заявитель выполнял люциферазный анализ.

В этом анализе установлено, что как гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, так и гомодимер ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc являются мощными ингибиторами активина А, активина В, GDF11 и GDF8. В частности, как можно видеть в сравнительных данных об IC₅₀ гомодимера/гетеродимера, проиллюстрированных на фиг. 13, гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc ингибирует пути передачи сигнала активина А, активина В, GDF8 и GDF11 аналогично гомодимеру ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Однако ингибирование путей передачи сигнала BMP9 и BMP10 гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc значительно снижено по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Эти данные находятся в соответствии с рассмотренными выше данными о связывании, где наблюдали, что как гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, так и гомодимер ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc демонстрируют сильное связывание с активинном А, активинном В, GDF8 и GDF11, но BMP10 и BMP9 имеют значительно сниженную аффинность к гетеродимеру ALK4-Fc:ActRIIB-Fc по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc.

Следовательно, вместе эти данные показывают, что гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc является более избирательным антагонистом активина В, активина А, GDF8 и GDF11 по сравнению с гомодимером ActRIIB-Fc. Соответственно, гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc более эффективен, чем гомодимер ActRIIB-Fc, в определенных применениях, где такой избирательный антагонизм благоприятен. Примеры включают терапевтические применения, где желательно сохранять антагонизм для одного или нескольких из активина А, активина В, активина АВ, GDF8 и GDF11, но минимизировать антагонизм для одного или нескольких из BMP9, BMP10, GDF3 и BMP6.

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

Гомодимерные и гетеродимерные комплексы тестировали у мышей для того, чтобы исследовать различия в их профилях активности *in vivo*. Мышам C57BL/6 дикого типа дозировали подкожно гомодимер ActRIIB-Fc (10 мг/кг), гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc (3 или 10 мг/кг) или наполнитель (фосфатно-солевой буфер, PBS) два раза в неделю в течение 4 недель, начиная приблизительно с возраста 10 недель (n=9 мышей на группу). Гомодимер ALK4-Fc не тестировали *in vivo* из-за его неспособности связывать лиганды с высокой аффинностью в условиях без клеток, как определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Конечные точки исследований включали: масса тела; общая масса нежировых тканей и общая масса жировой ткани, как определяют посредством ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на базовом уровне и по завершении исследования (4 недели); общая минеральная плотность кости, как определяют посредством двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на базовом уровне и через 4 недели; и массы икроножных мышц, прямых мышц бедра и грудных мышц определяли через 4 недели.

Активность комплексов ActRIIB-Fc и ALK4-Fc у мышей дикого типа				
Конечная точка (4 недели)	Наполнитель	Гомодимер ActRIIB-Fc 10 мг/кг	Гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc	
			10 мг/кг	3 мг/кг
Измерение массы тела относительно базового уровня	↑ 15%	↑ 38% **	↑ 41% **	↑ 33% **
Изменение общей массы нежировых тканей относительно базового уровня	↓ 1%	↑ 5% **	↑ 5% **	↑ 5% **
Изменение общей массы жировой ткани относительно базового уровня	↑ 5%	↓ 3,6% **	↓ 3,5% **	↓ 3,5% **
Изменение общей минеральной плотности кости относительно базового уровня	↑ 8%	↑ 14% *	↑ 12% *	↑ 11%
Масса икроножной мышцы †	23	36 **	35 **	30 **
Масса мышцы бедра †	11,5	17 **	16 **	14 **
Масса грудной мышцы †	15	23 **	28 **	23 **

*P < 0,05 в сравнении с наполнителем.

**P < 0,01 в сравнении с наполнителем.

† Объединенные массы левых и правых мышц, нормализованные к длине бедра (мг/мм), чтобы контролировать размер тела.

Результаты исследований сведены выше в таблице. Как ожидали, гомодимер ActRIIB-Fc вызывал заметные изменения в составе тела, многие в соответствии с известными эффектами ингибирования GDF8 и активина. Лечение мышей дикого типа гомодимером ActRIIB-Fc больше чем удваивало прирост массы тела в течение исследования по сравнению с контролями, которые лечили наполнителем. Этому чистому приросту массы сопутствовали значительные увеличения общей массы нежировых тканей и общей минеральной плотности кости, а также значительное снижение общей массы жировой ткани, по сравнению с наполнителем. Следует понимать, что нормализованные (процентные) изменения в нежировых и жировых тканях отличаются от соответствующих им абсолютных изменений, поскольку масса нежировых тканей (обычно приблизительно 70% массы тела мыши) значительно больше, чем масса жировой ткани (обычно приблизительно 10% массы тела). Исследовали отдельные скелетные мышцы, включая икроножные, бедренные и грудные, у всех значительно возросла масса по сравнению с контролем с наполнителем в течение лечения гомодимером ActRIIB-Fc.

Гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc вызывал определенные эффекты, удивительно схожие с таковыми гомодимера ActRIIB-Fc, несмотря на различную лигандную избирательность двух комплексов. Как показано выше в таблице, лечение мышей гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc при уровне дозы 10 мг/кг совпадало, почти совпадало или превышало эффекты гомодимера ActRIIB-Fc при том же уровне дозы для всех перечисленных конечных точек. Эффекты гетеродимера ALK4-Fc:ActRIIB-Fc при 3 мг/кг были слегка ослаблены для некоторых конечных точек по сравнению с 10 мг/кг, таким образом предоставляя свидетельство зависимости доза-эффект.

Таким образом, гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc проявляет полезные анаболические эффекты, оказываемые на скелетные мышцы и кость, и катаболические эффекты, оказываемые на жировую ткань, которые очень схожи с таковыми у гомодимера ActRIIB-Fc. Однако в отличие от гомодимера ActRIIB, гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc демонстрирует только низкую аффинность или временное связывание с BMP9 и BMP10, и поэтому будет иметь небольшое или нулевое конкурентное ингибирование процессов, опосредуемых этими лигандами, таких как ангиогенез. Эту новую избирательность можно использовать, например, при лечении пациентов, нуждающихся в стимулирующих эффектах, оказываемых на мышцы и кость, и ингибирующих эффектах, оказываемых на жир, но не нуждающихся в измененном ангиогенезе.

Пример 4. Лечение гетеромультимером ALK4:ActRIIB подавляет фиброз и воспаление почек и снижает повреждение почек.

Эффекты гетеродимера ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, описанные в примере 2, оказываемые почечное заболевание, оценивали в модель односторонней обструкции мочеочника на мышах. См., например, Klahr and Morrissey (2002) *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F861-F875.

24 самцов мышей C57BL/6 в возрасте 12 недель подвергали левому одностороннему лигированию два раза на уровне нижнего конца почки. После 3 суток 8 мышей умерщвляли и у индивидуальных животных брали почки для того, чтобы оценивать повреждение почек. Остальных мышей рандомизировали в две группы: i) 8 мышам инъецировали подкожно гетеродимер ALK4-Fc:ActRIIB-Fc в дозе 10 мг/кг в сутки 3, сутки 7, сутки 10 и сутки 14 после хирургического вмешательства и ii) 8 мышам инъецировали подкожно контроль с наполнителем, фосфатно-солевой буфер (PBS), в сутки 3, сутки 7, сутки 10 и сутки 14 после хирургического вмешательства. Обе группы умерщвляли в сутки 17 в соответствии с релевантными Animal Care Guidelines. Половины почек от индивидуальных животных собирали для гистологического анализа (ГЭ и окрашивание трихром по Массону), как от UUO почек, так и от и контралатеральных почек, и 1/4 почек использовали для экстрагирования РНК (RNeasy Midi Kit, Qiagen, IL).

Анализ экспрессии генов в образцах UUO почек осуществляли для того, чтобы оценивать уровни различных генов. qRT-PCR осуществляли в системе обнаружения CFX Connect™ Real-time PCR (Bio-Rad, CA) для того, чтобы оценивать экспрессию различных генов фиброза (Colla1, фибронектин, PAI-1, CTGF и α -SMA), воспалительных генов (TNF α и MCP1), цитокинов (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 и активин A) и генов повреждения почек (NGAL). См. фиг. 14. Лечение мышей гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc значительно подавляло экспрессию генов фиброза и воспалительных генов, ингибировало повышающую регуляцию TGF- β 1/2/3 и снижало повреждение почек. Гистологические данные подтверждали, что лечение гетеродимером ALK4-Fc:ActRIIB-Fc значительно ингибировало фиброз почек и снижало повреждение почек в модели UUO.

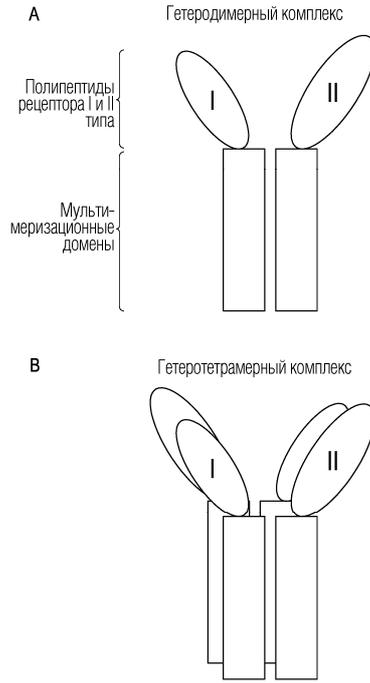
Вместе эти данные демонстрируют, что лечение гетеромультимером ALK4:ActRIIB подавляет фиброз и воспаление почек и снижает повреждение почек. Кроме того, эти данные показывают, что другие антагонисты ALK4:ActRIIB можно использовать при лечении или предотвращении почечного заболевания, включая, например, антагонисты ALK4- и/или ActRIIB-связывающих лигандов, антагонисты рецепторов ALK4 и/или ActRIIB, антагонисты медиаторов передачи сигналов ALK4 и/или ActRIIB ниже по каскаду (например, SMAD) и антагонисты корцепторов суперсемейства TGF- β , которые связаны с ALK4 и/или ActRIIB.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

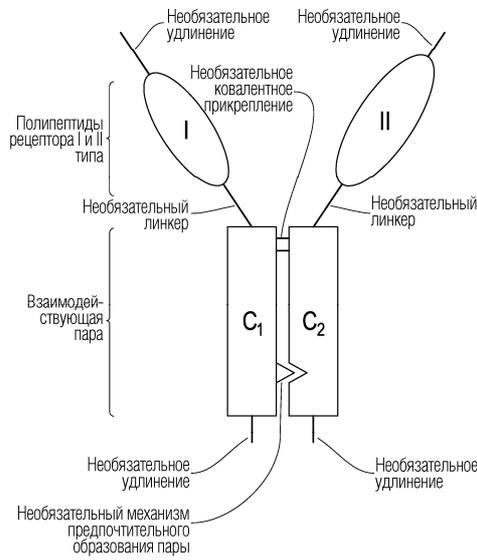
1. Рекомбинантный гетеромультимер, содержащий полипептид активинподобной киназы-4 (ALK4) и полипептид рецептора активина IIB (ActRIIB), где полипептид ALK4 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 34-101 последовательности SEQ ID NO: 9, и где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1, где полипептид не содержит аспарагиновую кислоту (D) в аминокислотном положении, соответствующем L7 9 последовательности SEQ ID NO: 1.
2. Рекомбинантный гетеромультимер по п.1, где полипептид ALK4 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 34-101 последовательности SEQ ID NO: 9.
3. Рекомбинантный 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. Рекомбинантный гетеромультимер по любому из пп.1-3, где полипептид ALK4 содержит аминокислоты 34-101 последовательности SEQ ID NO: 9.
5. Рекомбинантный гетеромультимер по любому из пп.1-4, где полипептид ActRIIB содержит аминокислоты 2 9-109 последовательности SEQ ID NO: 1.
6. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.1-5, в котором полипептид ALK4 и/или ActRIIB представляет собой слитый белок, дополнительно содержащий гетерологичный домен.
7. Рекомбинантный гетеромультимер по п.6, в котором гетерологичный домен содержит Fc домен иммуноглобулина.
8. Рекомбинантный гетеромультимер по п.7, в котором Fc домен иммуноглобулина содержит одну или несколько модификаций аминокислот, которые содействуют формированию гетеродимера.
9. Рекомбинантный гетеромультимер по п.7 или 8, в котором Fc-домен иммуноглобулина содержит одну или несколько модификаций аминокислот, которые ингибируют формирование гомодимера.
10. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.7-9, в котором гетерологичный домен содержит Fc домен иммуноглобулина из иммуноглобулина IgG.
11. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.6-10, в котором слитый белок дополнительно содержит линкерный домен, расположенный между доменом ALK4 и гетерологичным доменом, и/или линкерный домен, расположенный между доменом ActRIIB и гетерологичным доменом.
12. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.1-11, в котором полипептид ALK4 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 липидным фрагментом.
13. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.1-12, в котором полипептид ALK4 и/или полипептид ActRIIB является гликозилированным в клеточной линии яичника китайского хомяка.
14. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.1-13, где гетеромультимер связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из активина А, активина В, GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 и GDF3.
15. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.1-14, где гетеромультимер ингибирует передачу сигнала лиганда в анализе на основе клеток и где лиганд выбирают из группы, состоящей из активина А, активина В, GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 и GDF3.
16. Рекомбинантный гетеромультимер по любому одному из пп.1-15, где гетеромультимер представляет собой гетеродимер ALK4:ActRIIB.
17. Фармацевтический препарат для лечения ALK4:ActRIIB ассоциированной болезни или нарушения, который содержит гетеромультимер по любому одному из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.
18. Фармацевтический препарат по п.17, который, по существу, не содержит пирогены.
19. Фармацевтический препарат по любому одному из пп.17-18, который содержит меньше чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2% или меньше чем 1% гомомультимеров ALK4.
20. Фармацевтический препарат по п.17-19, который содержит меньше чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2% или меньше чем 1% гомомультимеров ActRIIB.
21. Способ лечения пациента, имеющего нарушение, связанное с потерей мышцы или недостаточным ростом мышцы, который включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества гетеромультимера по любому из пп.1-16.
22. Способ по п.21, в котором пациент имеет нарушение, выбранное из группы, состоящей из атрофии мышц, мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Дюшенна, плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии, амиотрофического бокового склероза, кахексии, связанной со злокачественной опухолью или терапией злокачественной опухоли.

23. Способ лечения пациента, имеющего нарушение, связанное с нейродегенерацией, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества гетеромультимера по любому из пп.1-16.

24. Способ по п.23, в котором нарушением является амиотрофический боковой склероз.



Схематический гетеромерный белковый комплекс

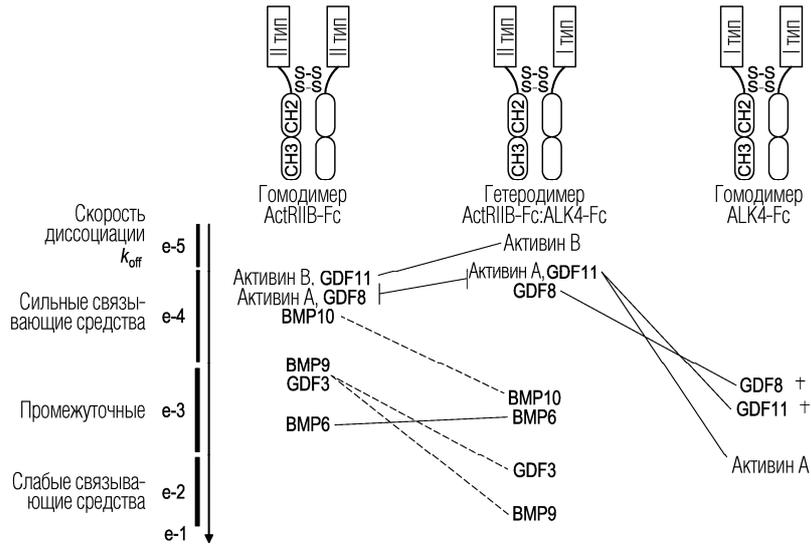


ActRIIa ILGRSETQEC IFFMANWEKD RTNQTGVFPC YGDKDKRRHC FADWKNISGS
 ActRIIb GRGEAETREC IMYNAWELE RTNOSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKGGCWL DDINCYDRID CVKPKDSPEV YFCCEGNMC NEKFSYFPPEM
 IELVKKGGCWL DDFNCSYRDE CVLPEENPQV YFCCEGNFC NERFTHLPEA

EVIQPTSNPV TRKPPT
 GGPEVTYEPF PТАРТ

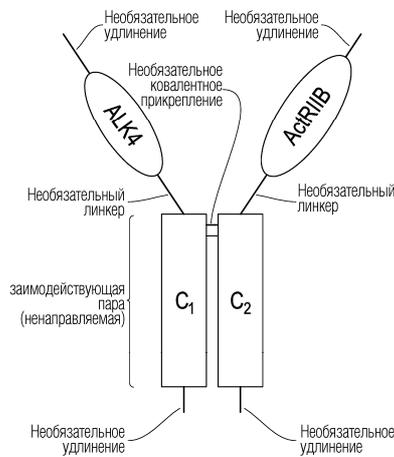
Фиг. 3



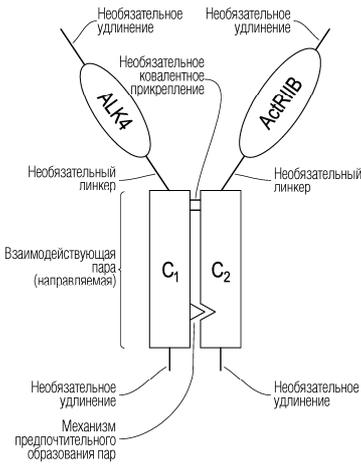
Фиг. 6

	10	20	30	40	50																																													
Человек	S	G	P	R	G	V	Q	A	L	L	C	A	C	T	S	C	L	Q	A	N	Y	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	I	F	N	L	D	G	M	E	N	H	V	R	T	C	I	P	K	V
Крот	S	G	P	R	G	I	Q	A	L	L	C	A	C	T	S	C	L	Q	A	N	L	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	I	F	N	L	D	G	L	E	N	H	V	R	T	C	I	P	K	V
Еж	S	G	P	R	G	I	Q	A	L	L	C	A	C	T	S	C	L	Q	T	N	Y	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	I	F	N	L	D	G	M	E	N	H	V	R	T	C	I	P	K	V
Курица	-	A	P	G	G	A	R	A	L	T	C	L	C	S	D	C	K	Q	A	N	S	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	V	F	N	L	D	G	V	K	H	H	V	R	T	C	I	P	E	A
Мышь	S	G	P	R	G	I	Q	A	L	L	C	A	C	T	S	C	L	Q	T	N	Y	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	I	F	N	L	D	G	V	E	N	H	V	R	T	C	I	P	K	V
Свинья	S	G	P	R	G	I	Q	A	L	L	C	A	C	T	S	C	L	Q	A	N	Y	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	I	F	N	L	D	G	M	E	N	H	V	R	T	C	I	P	K	V
Ras	S	G	P	R	G	I	Q	A	L	L	C	A	C	T	S	C	L	Q	T	N	Y	T	C	E	T	D	G	A	C	M	V	S	I	F	N	L	D	G	M	E	N	H	V	R	T	C	I	P	K	V
	60	70	80	90	100																																													
Человек	E	L	V	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	T	D	Y	C	N	R	I	D	L	R	V	P	S	G	H	L	K	E	P	E	H	P	S	M	W	G
Крот	E	L	V	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	T	D	F	C	N	K	I	D	L	R	V	P	S	G	H	V	K	E	P	E	R	P	S	V	W	G
Еж	E	L	V	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	T	D	F	C	N	R	I	D	L	R	V	P	S	G	H	P	K	E	S	E	Q	A	S	M	W	G
Курица	K	L	I	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	S	D	F	C	N	K	I	D	L	M	V	P	S	G	H	L	K	D	N	E	P	P	S	S	W	G
Мышь	E	L	V	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	I	D	F	C	N	K	I	D	L	R	V	P	S	G	H	L	K	E	P	A	H	P	S	M	W	G
Свинья	E	L	V	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	T	D	F	C	N	K	I	D	L	R	V	P	S	G	H	L	K	E	P	E	H	P	S	M	W	G
Ras	E	L	V	P	A	G	K	P	F	Y	C	L	S	S	E	D	L	R	N	T	H	C	C	Y	I	D	F	C	N	K	I	D	L	R	V	P	S	G	H	L	K	E	P	E	H	P	S	M	W	G
Человек	P	V	E																																															
Крот	P	V	E																																															
Еж	P	V	E																																															
Курица	P	V	E																																															
Мышь	P	V	E																																															
Свинья	P	V	E																																															
Ras	P	V	E																																															

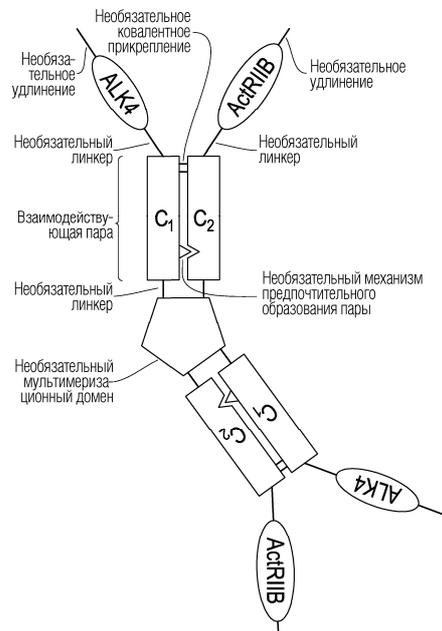
Фиг. 7



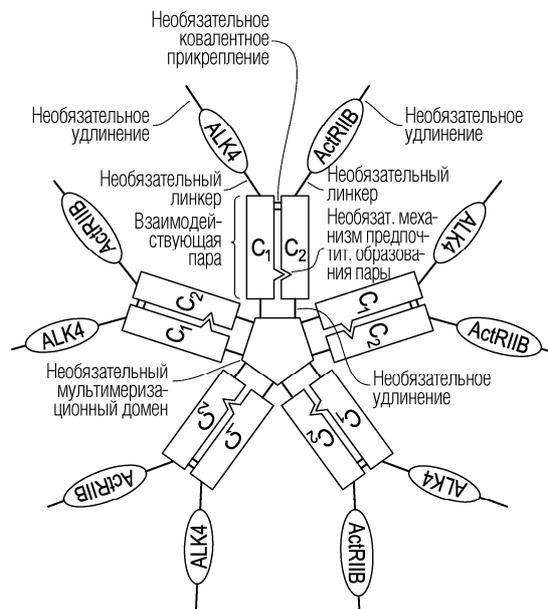
Фиг. 8А



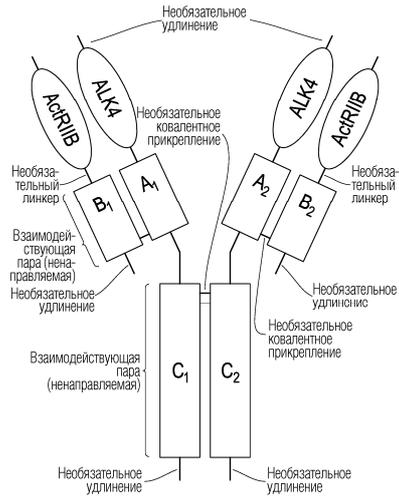
Фиг. 8В



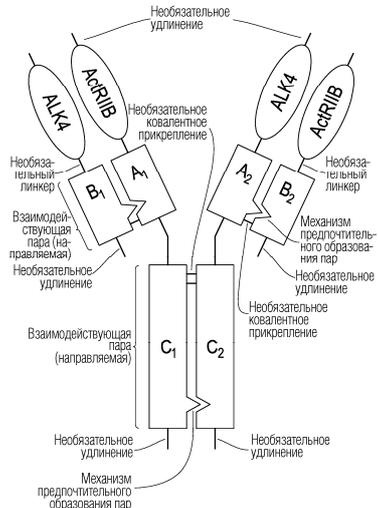
Фиг. 8С



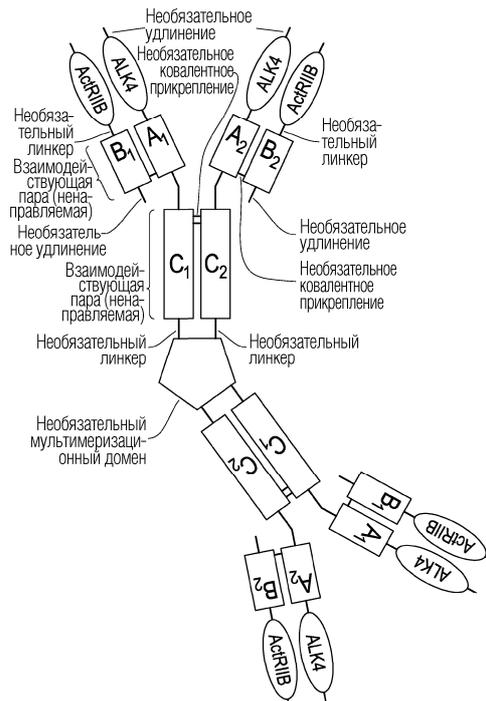
Фиг. 8D



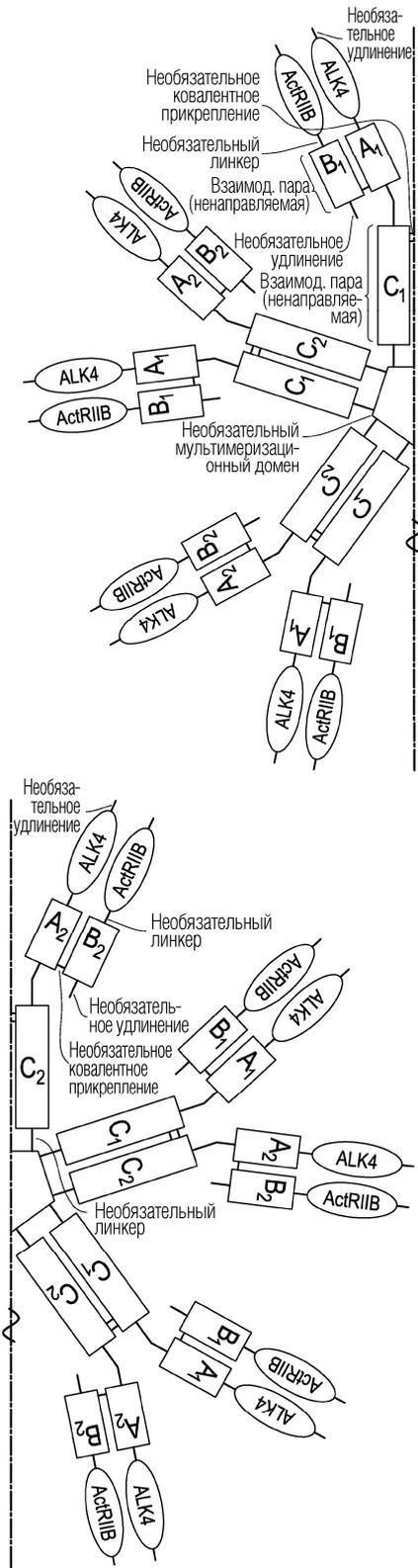
Фиг. 9А



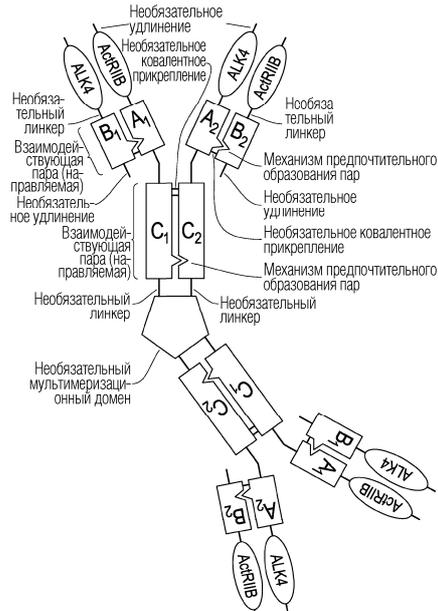
Фиг. 9В



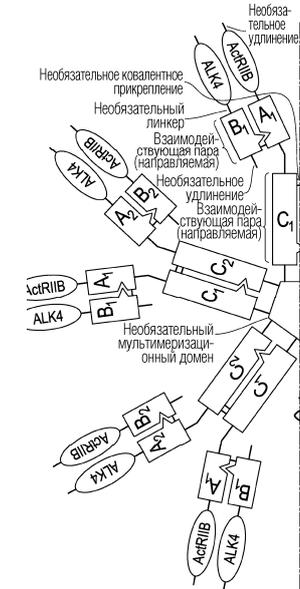
Фиг. 9С



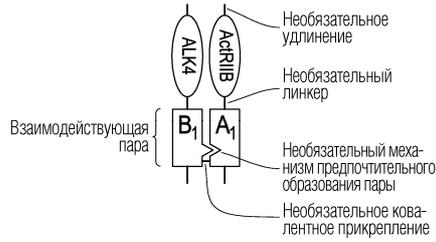
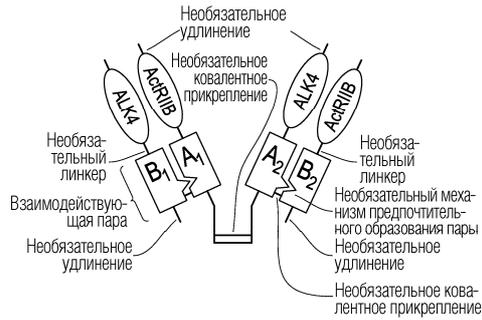
Фиг. 9D



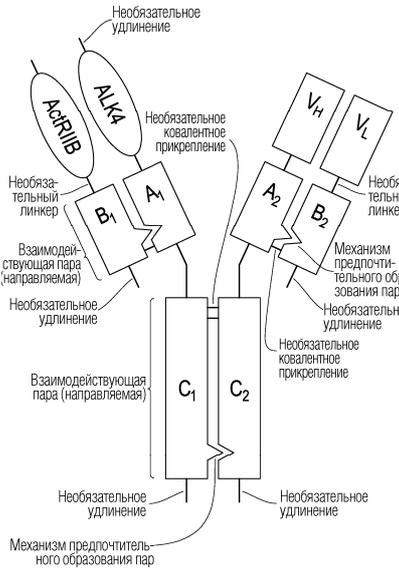
Фиг. 9Е



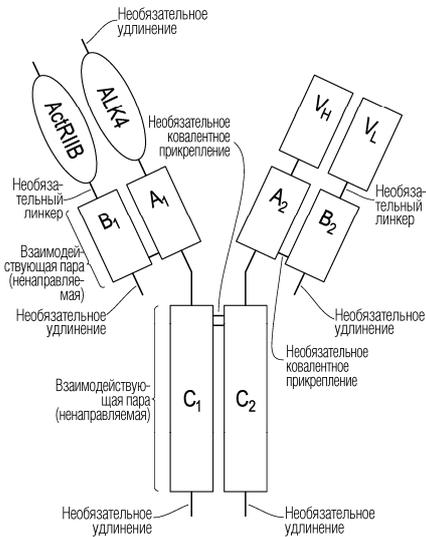
Фиг. 9F



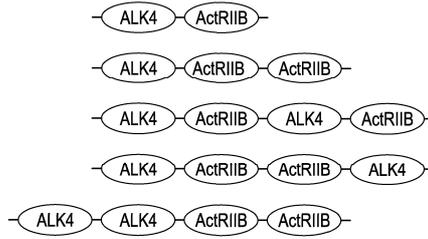
Фиг. 9G



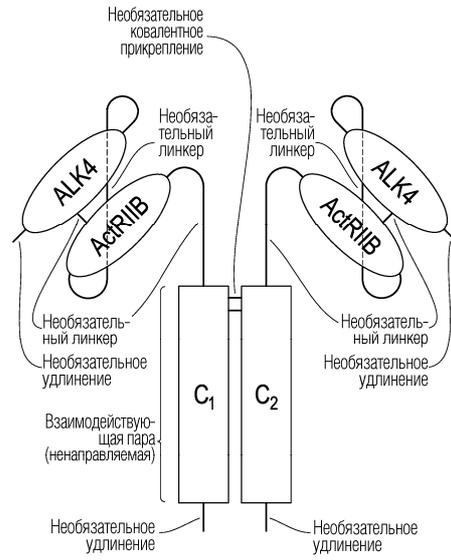
Фиг. 10A



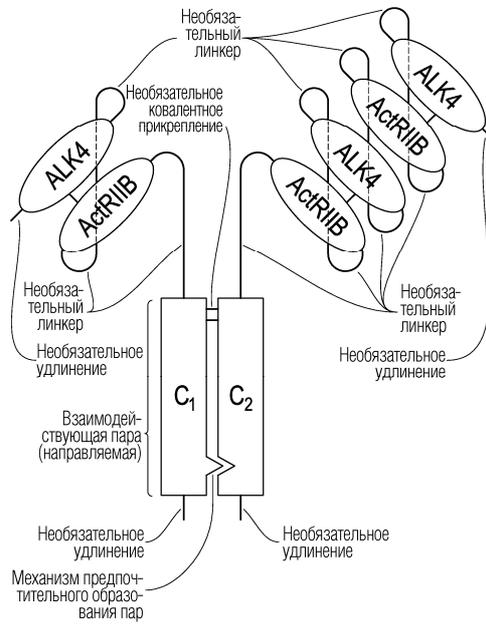
Фиг. 10B



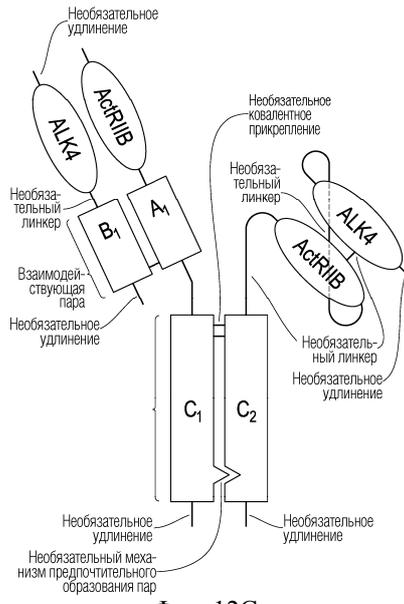
Фиг. 11



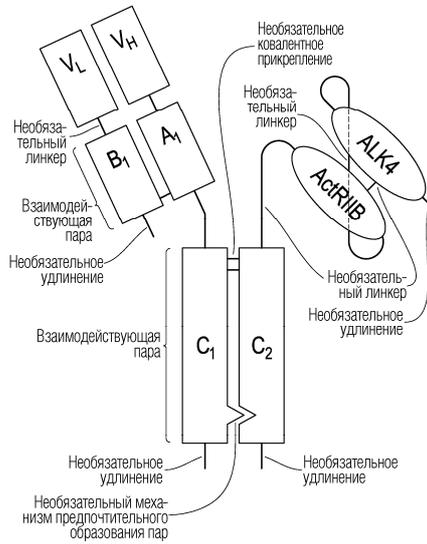
Фиг. 12А



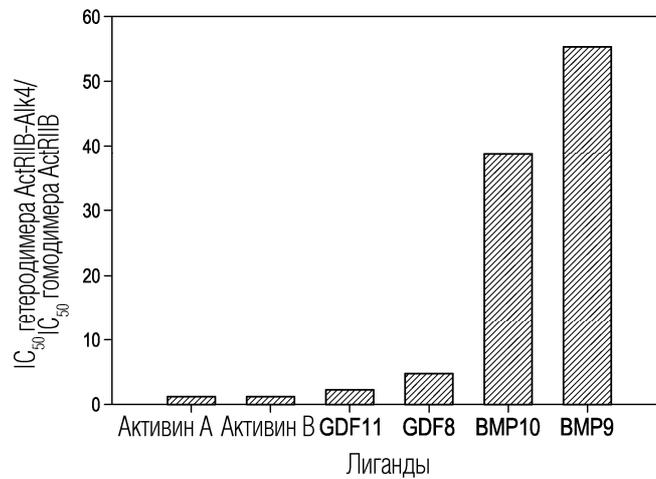
Фиг. 12В



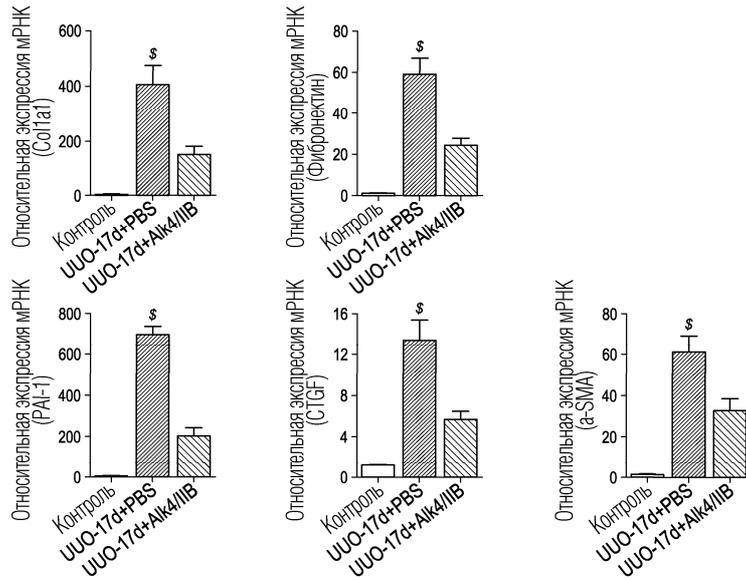
Фиг. 12С



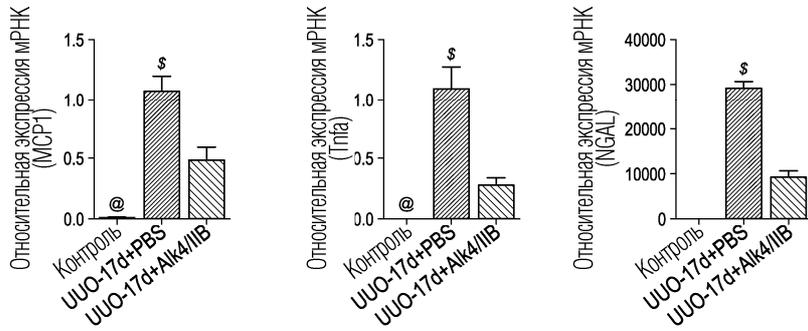
Фиг. 12D



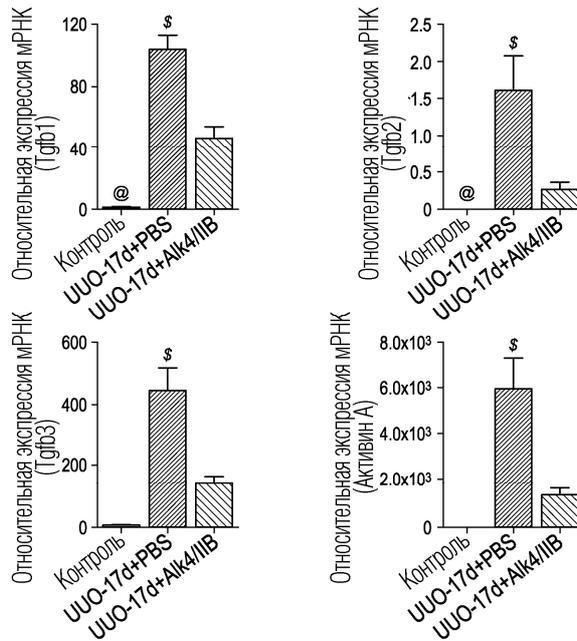
Фиг. 13



Фиг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 14С

