

REFERINȚE ÎNCRUCIȘATE LA CERERI CONEXE

Această cerere revendică beneficiul priorității cererilor provizorii cu numerele de serie din Statele Unite 62/362.955, depusă la data de 15 iulie 2016; 62/453.888, depusă la data de 2 februarie 2017; și 62/510.403, depusă la data de 24 mai 2017.

BAZELE INVENȚIEI

Hipertensiunea pulmonară (PH) este o boală caracterizată prin presiune ridicată a sângelui în vasculatura pulmonară, incluzând arterele pulmonare, venele pulmonare și capilarele pulmonare. În general, PH este definită ca o presiune arterială pulmonară medie (PA) ≥ 25 mm Hg în repaus sau ≥ 30 mm Hg cu exercițiu [Hill și colab., *Respiratory Care* 54(7):958-68 (2009)]. Principalul simptom al PH este dificultatea respirației sau scurtarea respirației, și alte simptome includ oboseală, amețeli, leșin, edem periferic (umflături la nivelul piciorului, picioarelor sau gleznelor), buze și piele albastrui, dureri toracice, angina pectorală, amețeală în timpul unor exerciții, tuse neproductivă, puls crescut și palpitații. PH poate fi o boală severă care provoacă insuficiență cardiacă, care este una dintre cele mai frecvente cauze de deces la persoanele cu hipertensiune pulmonară. Hipertensiunea pulmonară postoperatorie poate complica multe tipuri de intervenții chirurgicale sau proceduri și poate prezenta o provocare asociată cu o mortalitate ridicată.

PH poate fi grupată pe baza diferitelor manifestări ale bolii care au în comun similitudini a mecanismelor fiziopatologice, prezentarea clinică și abordările terapeutice [Simonneau și colab., *JACC* 54(1):S44-54 (2009)]. Clasificarea clinică a PH a fost propusă pentru prima dată în 1973, iar o clasificare clinică recentă actualizată a fost aprobată de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) în 2008. Conform clasificării clinice actualizate a PH-ului, există cinci grupe principale de PH: hipertensiunea arterială pulmonară (PAH), caracterizată printr-o presiune capilară PA ≤ 15 mm Hg; PH datorită unei boli cardiace stângi (cunoscută și sub numele de hipertensiune venoasă pulmonară sau insuficiență cardiacă congestivă), caracterizată printr-o presiune capilară PA > 15 mm Hg; PH datorită bolilor pulmonare și/sau hipoxiei; PH de tromboembolii cronice; și PH cu etiologii neclare sau multifactoriale [Simonneau și colab., *JACC* 54(1):S44-54 (2009); Hill și colab., *Respiratory Care* 54(7):958-68 (2009)]. PAH este clasificată în continuare în PAH idiopatică (IPAH), o boală sporadică în care nu există nici un istoric familial de PAH, niciun factor de risc identificat; PAH ereditar; PAH indusă de medicamente și toxine; PAH asociată cu boli ale țesutului conjunctiv, infecție HIV, hipertensiune portală, boli congenitale ale inimii, schistosomiază și anemie hemolitică cronică; și PH persistent al nou-născuților [Simonneau și colab., *JACC* 54(1):S44-54 (2009)]. Diagnosticul diferitelor tipuri de PH necesită o serie de teste.

În general, tratamentul PH depinde de cauza sau clasificarea PH. În cazul în care PH este cauzat de un medicament cunoscut sau de o afecțiune medicală, este cunoscut sub numele de PH secundar, și tratamentul său este de obicei îndreptat către boala de bază. Tratamentul hipertensiunii pulmonare venoase implică, în general, optimizarea funcției ventriculare stângi prin administrarea de diuretice, beta-blocante și inhibitori ai ACE, sau repararea sau înlocuirea unei valve mitrale sau aortice. Terapiile PAH includ vasodilatatoare pulmonare, digoxină, diuretice, anticoagulante și oxigenoterapie. Vasodilatatoarele pulmonare vizează căi diferite, incluzând calea prostacilinei (de exemplu, prostacilină, inclusiv epoprostenol intravenos, treprostinil subcutanat sau intravenos și iloprost inhalat), calea oxidului azotic (de exemplu, inhibitori ai fosfodiesterazei-5, inclusiv sildenafil și tadalafil) și calea endotelinei-1 (de exemplu, antagoniști ai receptorilor de endotelină, inclusiv bosentan oral și ambrisentan oral) [Humbert, M. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179:650-6 (2009); Hill

și colab., Respiratory Care 54(7):958-68 (2009)]. Cu toate acestea, terapiile curente nu oferă nici un remediu pentru PH și nu tratează direct remodelarea vasculară subiacentă și muscularizarea vaselor de sânge observate la mulți pacienți cu PH. EP2594280 se referă la utilizarea neutralizatorilor de activină pentru tratamentul bolilor asociate cu activarea aberantă a "răspunsului de apărare a gazdei". AU2012244215 se referă la metode și compoziții care cuprind polipeptide ale receptorului de ActRII pentru utilizare în tratarea bolilor asociate cu activitate anormală a unei proteine de ActRII și/sau a unui ligand de ActRII, inclusiv boală pulmonară.

Astfel, există o nevoie stringentă, neîndeplinită de terapii eficiente pentru tratarea hipertensiunii pulmonare. În consecință, un obiect al prezentei dezvăluiri constă în furnizarea unor compoziții pentru utilizarea în tratarea, prevenirea sau reducerea ratei de progresare și/sau a severității PH, în special tratarea, prevenirea sau reducerea ratei de progresare și/sau a severității unuia sau mai multor complicații asociate cu PH.

DESCRIERE PE SCURT

Obiectul pentru care se solicită protecție este definit în revendicările 1-24.

În acest sens, prezenta invenție redă o compoziție pentru utilizarea în tratarea hipertensiunii arteriale pulmonare, în care compoziția cuprinde administrarea unui pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă ActRIIA cuprinzând o secvență de aminoacizi care este cel puțin 80% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 32. Prezenta invenție redă, de asemenea, o compoziție pentru utilizarea în tratarea hipertensiunii arteriale pulmonare, în care compoziția cuprinde administrarea unui pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente dintr-o polipeptidă ActRIIA cuprinzând o secvență de aminoacizi care este cel puțin 80% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 39. Într-un caz, pacientul are o presiune arterială pulmonară în repaus (PAP) de cel puțin 25 mm Hg. Într-un alt caz, compoziția destinată utilizării reduce PAP la pacient; scade hipertrofia ventriculului la pacient; scade hipertrofia musculaturii netede la pacient; scade muscularitatea arteriolei pulmonare la pacient; scade rezistența vasculară pulmonară la pacient; reduce rezistența vasculară pulmonară la pacient; mărește presiunea capilară de blocare pulmonară; crește presiunea telediastolică a ventriculului stâng; crește capacitatea de exercițiu a pacientului; crește distanța de mers pe jos a pacientului de 6 minute; și/sau reduce indicele de dispnee Borg (BDI) al pacientului. Într-un caz, pacientul are hipertensiune pulmonară funcțională clasa II sau clasa III, așa cum este recunoscută de Organizația Mondială a Sănătății. Într-un alt caz, compoziția destinată utilizării previne sau întârzie progresarea clasei hipertensiunii pulmonare funcționale. Într-un alt caz, compoziția destinată utilizării promovează sau crește regresia clasei hipertensiunii pulmonare funcționale. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 85% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 90% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 95% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 99% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. Într-un alt caz, polipeptida constă din secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 32. Într-un caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 85% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 39. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 90% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 39. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de

aminoacizi care este cel puțin 95% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 39. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 99% identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 39. Într-un alt caz, polipeptida cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 39. Într-un alt caz, polipeptida constă din secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 39. Într-un caz, polipeptida face parte dintr-un complex proteic homodimer. Într-un alt caz, tratamentul cuprinde suplimentar administrarea unuia sau mai multor agenți selectați din grupul constând din: vasodilatatori, inhibitori de fosfodiesterază tip 5, stimulatori solubili de guanilat ciclază, agoniști ai receptorilor de prostaciclina și antagoniști ai receptorului de endotelina. Într-un caz, pacientul a fost tratat cu unul sau mai mulți vasodilatatori. Într-un alt caz, respectivul unul sau mai mulți vasodilatatori este selectat din grupul format din: bosentan, sildenafil, beraprost, macitentan, selexipag, epoprostenol, treprostinil, iloprost, ambrisentan, și tadalafil. Într-un caz, polipeptida ActRIIA se leagă la unul sau mai mulți liganzi selectați din grupul format din: activina A, activina B și GDF11.

În parte, datele prezentate aici demonstrează că antagoniștii (inhibitori) de GDF/BMP pot fi utilizați pentru tratarea hipertensiunii pulmonare. De exemplu, s-a demonstrat că o polipeptidă ActRIIA solubilă și un heterodimer ALK4: ActRIIB pot fi utilizați, individual, pentru a reduce tensiunea arterială, hipertrofia cardiacă și greutatea pulmonară într-un model de hipertensiune arterială pulmonară (PAH) indusă de monocrotalină. Efecte pozitive similare au fost observate pentru polipeptida ActRIIA în modelul de hipoxie Sugen a PAH. Analiza histologică a pus în evidență, în plus, că polipeptida ActRIIA a avut efecte surprinzătoare și semnificative asupra scăderii remodelării vasculare și a muscularizării vaselor de sânge, atât în modelele de PAH induse de monocrotalină cât și în cele de hipoxie, Sugen. Mai mult, atât polipeptida ActRIIA, cât și heterodimerul ALK4: ActRIIB au avut în mod surprinzător un efect mai mare asupra ameliorării diferitelor complicații ale PAH în comparație cu sildenafilul, care este un medicament aprobat pentru tratamentul PAH. Astfel, dezvoltarea stabilește că antagoniștii căilor de semnalizare ActRII (ActRIIA și ActRIIB) pot fi folosiți pentru a reduce severitatea hipertensiunii pulmonare. În timp ce polipeptidele solubile ActRIIA și heteromultimerii ALK4:ActRIIB pot afecta hipertensiunea pulmonară printr-un alt mecanism decât antagonismele ligandului ActRIIA/B, dezvoltarea demonstrează totuși, că agenții terapeutici dezirabili pot fi selectați pe baza activității antagonistului de semnalizare a ActRII. Prin urmare, în unele cazuri, dezvoltarea redă metode pentru utilizarea diferiților antagoniști de semnalizare a ActRII pentru tratarea hipertensiunii, în special a hipertensiunii pulmonare, incluzând, de exemplu, antagoniști care inhibă unul sau mai mulți liganzi de ActRIIA/B [de exemplu, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, și BMP10]; antagoniști care inhibă unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK7 și ALK5); și antagoniști care inhibă una sau mai multe componente de semnalizare în aval (de exemplu, proteine Smad cum ar fi Smad-uri 2 și 3). Așa cum se utilizează aici, astfel de antagoniști de semnalizare sunt denumiți în mod colectiv "antagoniști de GDF/BMP" sau "inhibitori de GDF/BMP". În consecință, dezvoltarea redă, parțial, compoziții antagoniste de GDF/BMP și compoziții pentru utilizare în tratarea hipertensiunii pulmonare (de exemplu, PAH), în special pentru tratarea uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare (de exemplu, presiune a sângelui crescută, hipertrofie cardiacă, remodelare vasculară, și muscularizarea vaselor). Antagoniștii de GDF/BMP care trebuie utilizați în conformitate cu metodele și utilizările conform dezvoltării includ, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRIIA solubile, polipeptide ActRIIB, heterodimeri ALK4: ActRIIB,

polipeptide folistatinice și polipeptide FLRG), antagoniști ai anticorpilor, antagoniști ai moleculelor mici și antagoniști ai nucleotidelor. Opțional, antagoniștii de GDF/BMP pot fi utilizați în combinație cu una sau mai multe terapii de susținere și/sau agenți activi suplimentari pentru tratarea hipertensiunii pulmonare.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea hipertensiunii arteriale pulmonare cuprinzând administrarea unui pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de polipeptidă ActRIIA. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70% (de exemplu, cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) identică cu o secvență de aminoacizi care începe la oricare dintre aminoacizii 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, sau 30 ai SEQ ID NO: 9 și se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135 ai SEQ ID NO: 9. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70% (de exemplu, cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) identică cu secvența de aminoacizi ai SEQ ID NO: 10. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70% (de exemplu, cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) identică cu secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 11. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA este o proteină de fuziune care cuprinde un domeniu ActRIIA și unul sau mai multe domenii polipeptidice heterologe cu ActRIIA. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA este o proteină de fuziune care cuprinde un domeniu Fc al unei imunoglobuline. În unele cazuri, domeniul Fc al imunoglobulinei este un domeniu Fc al unei imunoglobuline IgG1. În unele cazuri, proteina de fuziune ActRIIA cuprinde în plus un domeniu linker poziționat între domeniul polipeptidic ActRIIA și unul sau mai multe domenii heterologe (de exemplu, un domeniu de imunoglobulină Fc). În unele cazuri, domeniul linkerului este selectat din grupul format din: TGGG (SEQ ID NO: 23), TGGGG (SEQ ID NO: 21), SGGGG (SEQ ID NO: 22), GGGGS (SEQ ID NO: 25), GGG (SEQ ID NO: 19), GGGG (SEQ ID NO: 20), și SGGG (SEQ ID NO: 24). În unele cazuri, polipeptida ActRIIA cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 32. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 32. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA constă din secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 32. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA face parte dintr-un complex proteic homodimer. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA este glicozilată. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA are un model de glicozilare care poate fi obținut prin exprimarea într-o celulă ovariană de hamster chinez. În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade presiunea arterială pulmonară la pacient. În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade presiunea arterială pulmonară la pacient cu cel puțin 10% (de exemplu, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau cel puțin 80%). În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade hipertrofia ventriculului la pacient. În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade hipertrofia ventriculului la pacient cu cel puțin 10% (de exemplu, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau cel puțin 80%). În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade hipertrofia mușchiului neted la pacient. În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade hipertrofia mușchilor netezi la pacient cu cel puțin 10% (de exemplu, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%,

50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau cel puțin 80%). În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade muscularitatea arteriolei pulmonare la pacient. În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade muscularitatea arteriolei pulmonare la pacient cu cel puțin 10% (de exemplu, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau cel puțin 80%). În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade rezistența vasculară pulmonară la pacient. În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade rezistența vasculară pulmonară la pacient cu cel puțin 10% (de exemplu, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau cel puțin 80%). În unele cazuri, administrarea polipeptidei ActRIIA scade rezistența vasculară pulmonară la pacient cu cel puțin 25-30%. În unele cazuri, pacientul are hipertensiune arterială pulmonară și are hipertensiune pulmonară funcțională de clasa II sau clasa III în conformitate cu sistemul de clasificare funcțională a Organizației Mondiale a Sănătății pentru hipertensiunea pulmonară. În unele cazuri, pacientul are hipertensiune arterială pulmonară care este clasificată ca unul sau mai multe subtipuri selectate din grupul constând din: hipertensiune arterială pulmonară idiopatică sau ereditară, hipertensiune pulmonară indusă de medicamente și/sau toxine, hipertensiune pulmonară asociată cu boala țesutului conjunctiv și hipertensiune pulmonară asociată cu șunturi congenitale sistemice-la-pulmonare cel puțin 1 an după reparația șuntului. În unele cazuri, pacientul a fost tratat cu unul sau mai mulți vasodilatatori. În unele cazuri, pacientul a fost tratat cu unul sau mai mulți agenți selectați din grupul format din: inhibitori de fosfodiesterază tip 5, stimulatori solubili de guanilat ciclază, agonist al receptorului de prostaciclina și antagoniști ai receptorilor de endotelina. În unele cazuri, respectivul unul sau mai mulți agenți sunt selectați din grupul format din: bosentan, sildenafil, beraprost, macitentan, selexipag, epoprostenol, treprostinil, iloprost, ambrisentan, și tadalafil. În unele cazuri, metoda cuprinde în plus administrarea unuia sau mai multor vasodilatatori. În unele cazuri, metoda mai cuprinde administrarea unuia sau mai multor agenți selectați din grupul constând din: inhibitori de fosfodiesterază tip 5, stimulatori solubili de guanilat ciclază, agonist al receptorului de prostaciclina și antagoniști ai receptorului de endotelina. În unele cazuri, respectivul unul sau mai mulți agenți sunt selectați din grupul format din: bosentan, sildenafil, beraprost, macitentan, selexipag, epoprostenol, treprostinil, iloprost, ambrisentan și tadalafil. În unele cazuri, pacientul are o distanță de mers pe jos în 6 minute de la 150 la 400 de metri. În unele cazuri, metoda mărește distanța de mers pe jos în 6 minute a pacientului cu cel puțin 10 metri (de exemplu, cel puțin 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 sau mai mult de 400 de metri). În unele cazuri, pacientul are un nivel de hemoglobină de la > 8 și < 15 g/dl. În unele cazuri, metoda întârzie agravarea clinică a hipertensiunii arteriale pulmonare. În unele cazuri, metoda întârzie înrăutățirea clinică a hipertensiunii pulmonare în conformitate cu sistemul de clasificare funcțională a Organizației Mondiale a Sănătății pentru hipertensiunea pulmonară. În unele cazuri, metoda reduce riscul de spitalizare pentru una sau mai multe complicații asociate cu hipertensiunea arterială pulmonară. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIA se leagă la unul sau mai mulți liganzi selectați din grupul format din: activina A, activina B, GDF11, GDF8, BMP10 și BMP6.

În unele cazuri, prezenta dezvoltare se referă la metode de tratare a hipertensiunii pulmonare care cuprind administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la metode de prevenire a hipertensiunii pulmonare care constau în administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la

metode de reducere a vitezei de progresare a hipertensiunii pulmonare care cuprinde administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În unele cazuri, dezvoltarea redă o compoziție pentru utilizare în tratarea unei boli pulmonare interstițiale, care cuprinde administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP, în care antagonistul GDF/BMP inhibă una sau mai multe din activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, și ALK7. În unele cazuri, dezvoltarea redă o compoziție pentru utilizarea în tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severității uneia sau mai multor complicații ale unei boli pulmonare interstițiale, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP, în care antagonistul de GDF/BMP inhibă una sau mai multe dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și ALK7. În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este fibroza pulmonară idiopatică. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la metode de reducere a severității hipertensiunii pulmonare, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizare în tratarea uneia sau mai multor complicații (de exemplu, proliferarea mușchilor netezi și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară, angiogeneza în artera pulmonară, dispneea, durerea toracică, remodelarea vasculară pulmonară, hipertrofia ventriculară dreaptă și fibroză pulmonară) a hipertensiunii pulmonare cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în prevenirea uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare (de exemplu, proliferarea mușchilor netezi și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară, angiogeneza în artera pulmonară, dispneea, durerea toracică, remodelarea vasculară pulmonară, hipertrofia ventriculară dreaptă și fibroză pulmonară) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizare în reducerea vitezei de progresare a uneia sau mai multor complicații a hipertensiunii pulmonare (de exemplu, proliferarea mușchilor netezi și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară, angiogeneza în artera pulmonară, dispneea, durerea toracică, remodelarea vasculară pulmonară, hipertrofia ventriculară dreaptă și fibroză pulmonară)) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizare în reducerea severității uneia sau mai multor complicații a hipertensiunii pulmonare (de exemplu, proliferarea mușchilor netezi și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară, angiogeneza în artera pulmonară, dispneea, durerea toracică, remodelarea vasculară pulmonară, hipertrofia ventriculară dreaptă și fibroză pulmonară) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP sau a unei combinații de antagoniști de GDF/BMP. În anumite cazuri preferate, metodele descrise aici se referă la un pacient cu hipertensiune arterială pulmonară. În unele cazuri, metodele descrise aici se referă la un pacient având o presiune arterială pulmonară în repaus (PAP) de cel puțin 25 mm Hg (de exemplu, cel puțin 25, 30, 35, 40, 45 sau 50 mm Hg). În unele cazuri, metodele descrise aici reduc PAP la un pacient cu hipertensiune pulmonară. De exemplu, metoda poate reduce

PAP cu cel puțin 3 mmHg (de exemplu, cel puțin 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 sau 25 mm Hg) la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metodele descrise aici reduc rezistența vasculară pulmonară la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metodele descrise aici măresc presiunea capilară pulmonară de blocaj la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metodele descrise aici măresc presiunea ventriculară stângă diastolică de capăt la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metodele descrise aici măresc (îmbunătățesc) capacitatea de exercițiu (capacitate, toleranță) unui pacient cu hipertensiune pulmonară. De exemplu, metoda poate crește distanța de mers pe jos timp de 6 minute a unui pacient cu hipertensiune pulmonară, crescând opțional distanța de mers pe jos timp de 6 minute cu cel puțin 10 metri (de exemplu, cel puțin 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 sau mai mulți metri). În plus, metoda poate reduce indicele de dispnee Borg (BDI) al pacientului, care poate fi evaluat opțional după un test de mers pe jos timp de 6 minute. În unele cazuri, metoda reduce indicele de dispnee Borg (BDI) al pacientului cu cel puțin 0,5 puncte de indice (de exemplu, cel puțin 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 sau 10 puncte de indice). În unele cazuri, metodele descrise aici se referă la un pacient cu hipertensiune pulmonară de clasa I, clasa II, clasa III sau clasa IV, așa cum este recunoscută de Organizația Mondială a Sănătății. În unele cazuri, metodele descrise aici se referă la întârzierea progresării clinice (agravarea) hipertensiunii pulmonare (de exemplu, progresarea măsurată de standardul Organizației Mondiale a Sănătății). În unele cazuri, metoda previne sau întârzie progresarea clasei de hipertensiune pulmonară (de exemplu, previne sau întârzie progresarea de la clasa I la clasa a II-a, de la clasa a II-a la clasa a III-a sau de la clasa a III-a la clasa a IV-a a hipertensiunii pulmonare recunoscute de Organizația Mondială a Sănătății). În unele cazuri, metoda promovează sau crește regresia clasei hipertensiunii pulmonare (de exemplu, promovează sau crește regresia de la clasa a IV-a la clasa a III-a, de la clasa a III-a la clasa a II-a sau de la clasa a II-a la clasa I a hipertensiunii pulmonare, astfel cum este recunoscută de Organizația Mondială a Sănătății). În unele cazuri, pacientului i se administrează în continuare una sau mai multe terapii de susținere sau agenți activi pentru tratarea hipertensiunii pulmonare în plus față de unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP. De exemplu, pacientului i se poate administra, de asemenea, una sau mai multe terapii sau agenți activi de susținere selectați din grupul constând din: prostaciclina și derivații ai acesteia (de exemplu, epoprostenol, treprostinil și iloprost); agoniști ai receptorilor de prostaciclina (de exemplu, selexipag); antagoniști ai receptorilor de endotelina (de exemplu, telină, ambrisentan, macitentan și bosentan); blocante ale canalelor de calciu (de exemplu, amlodipină, diltiazem și nifedipină); anticoagulante (de exemplu, warfarină); diuretice; oxigenoterapie; septostomie atrială; tromboendarterectomie pulmonară; inhibitori de tip fosfodiesterază 5 (de exemplu, sildenafil și tadalafil); activatori de guanilat ciclază solubili (de exemplu, cinaciguat și riociguat); inhibitori de ASK-1 (de exemplu, CIIA; SCH79797; GS-4997; MSC2032964A; 3H-nafto[1,2,3-de]chinilin-2,7-dione, NQDI-1; 2-tioxo-tiazolidine, 5-bromo-3-(4-oxo-2-tioxo-tiazolidin-5-iliden)-1,3-dihidro-indol-2-onă); antagoniști de NF-κB (de exemplu, dh404, CDDO-epoxid; 2,2-difluoropropionamidă; C28 imidazol (CDDO-Im); acid 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic (CDDO); acid 3-Acetiloleanolic; acid 3-Trifluoroacetiloleanolic; 28-Metil-3-acetiloleanan; 28-Metil-3-trifluoroacetiloleanan; acid 28-Metiloxioleanolic; SZC014; SCZ015; SZC017; derivați PEGilați ai acidului oleanolic; acid 3-O-(beta-D-glucopiranozil) oleanolic; acid 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1-->3)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; acid 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1-->2)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; ester 28-O-beta-D-glucopiranozilic al acidului 3-O-[beta-D-

glucopiranozil-(1-->3)-beta-D-glucopiranozil]oleanolic; ester 28-O-beta-D-glucopiranozilic al acidului 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1-->2)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; acid 3-O-[alpha-L-ramnopiranozil-(1-->3)-beta-D-glucuronopiranozil] oleanolic; ester 28-O-beta-D-glucopiranozilic al acidului 3-O-[alfa-L-ramnopiranozil-(1-->3)-beta-D-glucuronopiranozil] oleanolic; acid 28-O-β-D-glucopiranozil-oleanolic; acid 3-O-β-D-glucopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranoziduronic (CS1); acid oleanolic acid 3-O-β-D-glucopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranoziduronic (CS2); 3,11-dioxoolean-12-en-28-olat de metil (DIOXOL); ZCVI₄-2; Benzil 3-dehidroxi-1,2,5-oxadiazolo[3',4':2,3]oleanolat) transplant pulmonar și/sau cardiac. În unele cazuri, pacientului i se poate administra, de asemenea, o polipeptidă BMP9. În unele cazuri, polipeptida BMP9 este o polipeptidă BMP9 matură. În unele cazuri, polipeptida BMP9 cuprinde o polipeptidă BMP9 prodomain. În unele cazuri, polipeptida BMP9 este administrată într-un preparat farmaceutic, care poate cuprinde opțional o polipeptidă BMP9 prodomain. În astfel de preparate farmaceutice de BMP9 care cuprind o polipeptidă BMP9 prodomain, polipeptida BMP9 poate fi asociată necovalent cu polipeptida BMP9 prodomain. În unele cazuri, preparatele farmaceutice de BMP9 sunt substanțial libere sau nu cuprind, polipeptida BMP9 prodomain. În unele cazuri, pacientului i se poate administra, de asemenea, acid oleanolic sau un derivat al acestuia.

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin GDF11 (de exemplu, un antagonist de GDF11). Efectele asupra inhibării GDF11 pot fi determinate, de exemplu, utilizând un test pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de GDF11. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de GDF11 cu un K_D de cel puțin 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă GDF11 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă GDF11 poate inhiba în plus una sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin GDF8 (de exemplu, un antagonist de GDF8). Efectele asupra inhibării GDF8 pot fi determinate, de exemplu, utilizând o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare a semnalizării Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de GDF8. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de GDF8 cu o K_D de

cel puțin 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă GDF8 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă GDF8 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin GDF3 (de exemplu, un antagonist de GDF3). Efectele asupra inhibării GDF3 pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de GDF3. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de GDF3 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă GDF3 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă GDF3 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin BMP6 (de exemplu, un antagonist de BMP6). Efectele asupra inhibării BMP6 pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se poate lega cel puțin de BMP6. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de BMP6 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă BMP6 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și ALK4: ActRIIB heteromultimeri), anticorpi, molecule mici, secvențe de

nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă BMP6 poate inhiba în plus una sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin BMP15 (de exemplu, un antagonist de BMP15). Efectele asupra inhibării BMP15 pot fi determinate, de exemplu, utilizând o analiză pe bază de celule, inclusiv pe cele descrise aici (de exemplu, un test de semnalizare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de BMP15. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de BMP15 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă BMP15 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă BMP15 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin BMP10 (de exemplu, un antagonist de BMP10). Efectele asupra inhibării BMP10 pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de BMP10. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de BMP10 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă BMP10 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice și polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB Polipeptide FLRG), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă BMP10 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP15, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin activina (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE) (de exemplu, un antagonist al activinei). Efectele asupra inhibării activinei pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de activină. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se leagă cel puțin de activină cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă activina pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști, care inhibă activina, poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: BMP15, GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În anumite cazuri preferate, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin activina B. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă de activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, de aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M) și/sau inhibă activitatea activinei A. În anumite cazuri preferate, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin activina B, dar nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă de activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, de aproximativ 1×10^{-8} M sau de aproximativ 1×10^{-9} M) și/sau inhibă activitatea activinei A.

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin ActRII (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB) (de exemplu, un antagonist de ActRII). Efectele asupra inhibării ActRII pot fi determinate, de exemplu, utilizând o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de ActRII. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se leagă cel puțin de ActRII cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă ActRII pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF,

polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă ActRII poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10, ALK4, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin ALK4 (de exemplu, un antagonist de ALK4). Efectele asupra inhibării ALK4 pot fi determinate, de exemplu, utilizând o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de ALK4. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de ALK4 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă ALK4 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă ALK4 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK5, ALK7 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin ALK5 (de exemplu, un antagonist ALK5). Efectele asupra inhibării ALK5 pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagoniști de GDF/BMP, sau o combinație de antagonist, conform dezvoltării se poate lega la cel puțin ALK5. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de ALK5 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă ALK5 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă ALK5 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6,

BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK7, ALK4 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3)

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin ALK7 (de exemplu, un antagonist ALK7). Efectele asupra inhibării ALK7 pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv cele descrise aici (de exemplu, o analiză de raportare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega cel puțin de ALK7. Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se leagă cel puțin de ALK7 cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă ALK7 pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă ALK7 poate inhiba în plus unul sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK5, ALK4 și unul sau mai multe Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care trebuie utilizată în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un agent care inhibă cel puțin una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). Efectele asupra inhibării Smad pot fi determinate, de exemplu, folosind o analiză pe bază de celule, inclusiv pe cele descrise aici (de exemplu, o analiză raportoare de semnalizare Smad). Prin urmare, în unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști conform dezvoltării se poate lega la cel puțin una sau mai multe una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). Activitatea de legare a ligandului poate fi determinată, de exemplu, utilizând o analiză de afinitate de legare, inclusiv cele descrise aici. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării se leagă cel puțin de una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3) cu o K_D cel puțin de 1×10^{-7} M (de exemplu, cel puțin 1×10^{-8} M, cel puțin 1×10^{-9} M, cel puțin 1×10^{-10} M, cel puțin 1×10^{-11} M, sau cel puțin 1×10^{-12} M). Așa cum este descris aici, diferiți antagoniști de GDF/BMP care inhibă una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3) pot fi utilizați în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici, incluzând, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRII, capcane de GDF, polipeptide folistatinice, polipeptide FLRG și heteromultimeri ALK4:ActRIIB), anticorpi, molecule mici, secvențe de nucleotide și combinații ale acestora. În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, care inhibă una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3) pot inhiba în plus una sau mai multe dintre: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK5 și ALK4.

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP care trebuie utilizat în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este o polipeptidă ActRII. Termenul "polipeptidă ActRII" se referă în colectiv la polipeptide ActRIIA și ActRIIB care apar natural, precum și la trunchieri și variante ale acestora, precum cele descrise aici (de exemplu, polipeptide capcană de GDF). De preferință, polipeptidele ActRII cuprind, constau în esență sau constau dintr-un domeniu de legare a ligandului a unei polipeptide ActRII sau a unei forme modificate (variantă) a acestuia. De exemplu, în unele cazuri, o polipeptidă ActRIIA cuprinde, constă în esență din sau constă dintr-un domeniu de legare a ligandului ActRIIA al unei polipeptide ActRIIA, de exemplu, o porțiune din domeniul extracelular ActRIIA. Similar, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde, consta în esență sau consta dintr-un domeniu de legare a ligandului ActRIIB al unei polipeptide ActRIIB, de exemplu, o porțiune din domeniul extracelular ActRIIB. De preferință, polipeptidele ActRII care trebuie utilizate în conformitate cu metodele descrise aici sunt polipeptide solubile.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții care cuprind o polipeptidă ActRIIA și utilizări ale acesteia. De exemplu, în unele cazuri, o polipeptidă ActRIIA din dezvoltare cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi 30-110 din SEQ ID NO: 9. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIA din dezvoltare cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune din ActRIIA începând cu un reziduu corespunzător oricărui dintre aminoacizii 21-30 (de exemplu, începând cu oricare dintre aminoacizii 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30) din SEQ ID NO: 9 și se termină într-o poziție corespunzătoare oricărui aminoacid 110-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135) din SEQ ID NO: 9. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 9. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 10. Încă în alte cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 11. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 32. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde, consta în esență sau consta dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 36. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde, consta în esență sau consta dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 39.

În alte cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții care cuprind o polipeptidă ActRIIB și utilizări ale acesteia. De exemplu, în unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB din dezvoltare cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu

secvența de aminoacizi 29-109 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi 29-109 din SEQ ID NO: 1, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid [care apare natural (E sau D) sau un aminoacid acid artificial] în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi 25-131 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi 25-131 din SEQ ID NO: 1, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvență care începe de la un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29 din SEQ ID NO: 1 și se termină la un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizi 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, sau 134 din SEQ ID NO: 1. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o secvență care începe de la un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29 din SEQ ID NO: 1 și se termină cu un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 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 sau 134 din SEQ ID NO: 1, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 2. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 2, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. Încă în alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 3. În altele, polipeptida ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 3, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. În alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%

97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 69. Încă în alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 74. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 74, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. Încă în alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 77. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 77, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. Încă în alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 78. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 78, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. Încă în alte cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 79. În unele cazuri, o polipeptidă ActRIIB poate cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 79, în care polipeptida ActRIIB cuprinde un aminoacid acid în poziția 79 față de SEQ ID NO: 1. În anumite cazuri, polipeptidele ActRIIB care trebuie utilizate în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici nu cuprind un aminoacid acid în poziția corespunzătoare lui L79 din SEQ ID NO: 1.

Așa cum este descris aici, polipeptidele ActRII, polipeptidele ALK4 și variantele acestora (capcane de GDF) pot fi homomultimeri, de exemplu, homodimer, homotrimeri, homotetrameri, homopentameri și complecși de homomultimeri de ordin superior. În anumite cazuri preferate, polipeptidele ActRII și variantele acestora sunt homodimeri. În anumite cazuri, dimerii polipeptidei ActRII descriși aici conțin o primă polipeptidă ActRII asociată covalent sau necovalent, cu o a doua polipeptidă ActRII în care prima polipeptidă cuprinde un domeniu de ActRII și o secvență de aminoacizi a unui prim membru (sau al doilea membru) al unei perechi de interacțiune (de exemplu, un domeniu constant al unei imunoglobuline) și a doua polipeptidă cuprinde o polipeptidă ActRII și o secvență de aminoacizi a unui al doilea membru (sau primul membru) al perechii de interacțiune.

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP care trebuie utilizat în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este un heteromultimer ALK4:ActRIIB. Așa cum este descris aici, s-a descoperit că un complex proteic heterodimer ALK4:ActRIIB are un profil/selectivitate de legare a ligandului diferite comparativ cu homodimerii ActRIIB și ALK4 corespunzători. În special, heterodimerul ALK4:ActRIIB prezintă o legare îmbunătățită la activina B în comparație cu oricare homodimer, păstrează legarea puternică la activina A, GDF8 și GDF11, așa cum s-a

observat cu homodimerul ActRIIB și prezintă o legare redusă substanțial la BMP9, BMP10 și GDF3. În special, BMP9 prezintă o afinitate scăzută sau deloc observabilă pentru heterodimerul ALK4:ActRIIB, în timp ce acest ligand se leagă puternic de homodimerul ActRIIB. La fel ca homodimerul ActRIIB, heterodimerul ALK4:ActRIIB păstrează legarea de BMP6 la un nivel intermediar. Vezi Figura 19. Aceste rezultate demonstrează, prin urmare, că heterodimerii ALK4:ActRIIB sunt antagoniști (inhibitori) mai selectivi ai activinei A, activinei B, GDF8 și GDF11 comparativ cu homodimerii ActRIIB. În consecință, un heterodimer ALK4:ActRIIB va fi mai util decât un homodimer ActRIIB în anumite aplicații în care un astfel de antagonism selectiv este avantajos. Exemplele includ aplicații terapeutice în care este de dorit să se păstreze antagonismul uneia sau mai multor activine (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina AC), GDF8 și GDF11, dar să se minimizeze antagonismul unuia sau mai multor BMP9, BMP10 și GDF3. Mai mult, s-a demonstrat că un heterodimer ALK4:ActRIIB tratează PAH la pacient. Fără a dori legarea de un anumit mecanism de acțiune, este de așteptat ca heteromultimerii ALK4:ActRIIB, precum și variantele acestora, care se leagă la cel puțin una sau mai multe dintre activine (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, și activina AC), GDF8 și/sau GDF11 să fie agenți utili pentru promovarea efectelor benefice la pacienții cu PAH.

Prin urmare, prezenta dezvăluire redă complecși heteromultimeri (heteromultimeri) care cuprind cel puțin o polipeptidă ALK4 și cel puțin o polipeptidă ActRIIB (heteromultimeri ALK4:ActRIIB), precum și utilizări ale acestora. De preferință, polipeptidele ALK4 cuprind un domeniu de legare a ligandului al unui receptor de ALK4, de exemplu, o porțiune din domeniul extracelular ALK4. Similar, polipeptidele ActRIIB cuprind în general un domeniu de legare a ligandului al unui receptor de ActRIIB, de exemplu, o porțiune din domeniul extracelular al ActRIIB. De preferință, astfel de polipeptide ALK4 și ActRIIB, precum și heteromultimerii rezultați ai acestora, sunt solubili.

În anumite cazuri, un heteromultimer ALK4:ActRIIB cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 34-101 din SEQ ID NO: 100. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB conțin o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 101. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 105. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 122. În alte cazuri, heteromultimeri ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 124. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 116. Încă în alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 117. În alte cazuri, heteromultimeri ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 111. Încă în alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 113.

În anumite cazuri, un heteromultimer ALK4:ActRIIB cuprinde o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 29-109 din SEQ ID NO: 1. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB conțin o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 2. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 3. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 5. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprinde o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 6. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80 %, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 118. Încă în alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 120 În alte cazuri, heteromultimeri ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 114. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB pot cuprinde o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 115. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 108. În alte cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB pot cuprinde o secvență de aminoacizi ActRIIB care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu SEQ ID NO: 110. În anumite cazuri preferate, heteromultimerii ALK4:ActRIIB nu cuprind o polipeptidă ActRIIB care cuprinde un aminoacid acid (de exemplu, un E sau D) în poziția corespunzătoare lui L79 din SEQ ID NO: 1.

Așa cum este descris aici, structurile heteromultimere ALK4:ActRIIB includ, de exemplu, heterodimeri, heterotrimeri, heterotetrameri, heteropentameri și complecși de heteromultimeri de ordin superior. Vezi, de exemplu, Figurile 21-23. În anumite cazuri preferate, heteromultimerii ALK4:ActRIIB sunt heterodimeri. În anumite cazuri, polipeptidele ALK4 și/sau ActRIIB pot fi proteine de fuziune.

În anumite cazuri, polipeptidele ActRII, polipeptidele ALK4, inclusiv variante ale acestora (de exemplu, capcane de GDF), pot fi proteine de fuziune. De exemplu, în unele cazuri, o polipeptidă ActRII (sau ALK4) poate fi o proteină de fuziune cuprinzând un domeniu polipeptidic de ActRII (sau ALK4) și unul sau mai multe domenii

polipeptidice heterologe (non-ActRII). În unele cazuri, o polipeptidă ActRII (sau ALK4) poate fi o proteină de fuziune care are, ca domeniu, o secvență de aminoacizi derivată dintr-o polipeptidă de ActRII (sau ALK4) (de exemplu, un domeniu de legare a ligandului la un receptor ActRII (sau ALK4) sau o variantă a acestuia) și unul sau mai multe domenii heterologe care oferă o proprietate dorită, cum ar fi farmacocinetica îmbunătățită, purificarea mai ușoară, direcționarea către anumite țesuturi, etc. De exemplu, un domeniu al unei proteine de fuziune poate îmbunătăți una sau mai multe dintre stabilitate in vivo, timp de înjumătățire in vivo, absorbție/administrare, localizare sau distribuție în țesut, formarea complexilor proteici, multimerizarea proteinei de fuziune și/sau purificarea. Opțional, un domeniu polipeptidic de ActRII (sau ALK4) al unei proteine de fuziune este conectat direct (fuzionat) la unul sau mai multe domenii polipeptidice heterologe sau poate fi poziționată o secvență intermediară, cum ar fi un linker, între secvența de aminoacizi a polipeptidei de ActRII (sau ALK4) și secvența de aminoacizi a unuia sau mai multor domenii heterologe. În anumite cazuri, o proteină de fuziune ActRII (sau ALK4) cuprinde un linker relativ nestructurat poziționat între domeniul heterolog și domeniul de ActRII (sau ALK4). Acest linker nestructurat poate corespunde la o regiune nestructurată de aproximativ 15 aminoacizi la capătul C-terminal al domeniului extracelular al ActRII (sau ALK4), sau poate fi o secvență artificială având între 3 și 15, 20, 30, 50 sau mai mulți aminoacizi care sunt relativ liberi de structura secundară. Un linker poate fi bogat în reziduuri de glicină și/sau prolină și poate, de exemplu, să conțină secvențe repetate de treonină/serină și glicine. Exemple de linkeri includ, dar nu se limitează la, secvențele de TGGG (SEQ ID NO: 23), SGGG (SEQ ID NO: 24), TGGGG (SEQ ID NO: 21), SGGGG (SEQ ID NO: 22), GGGGS (SEQ ID NO: 25), GGGG (SEQ ID NO: 20), și GGG (SEQ ID NO: 19). În unele cazuri, proteinele de fuziune ActRII (sau ALK4) pot cuprinde un domeniu constant al unei imunoglobuline, incluzând, de exemplu, porțiunea Fc a unei imunoglobuline. De exemplu, o secvență de aminoacizi care este derivată dintr-un domeniu Fc al unei imunoglobuline IgG (IgG1, IgG2, IgG3, sau IgG4), IgA (IgA1 sau IgA2), IgE, sau IgM. De exemplu, o porțiune Fc a unui domeniu de imunoglobulină poate cuprinde, consta în esență sau consta dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identic cu oricare dintre SEQ ID NO: 14-18. Astfel de domenii de imunoglobulină pot cuprinde una sau mai multe modificări ale aminoacizilor (de exemplu, deleții, aditii și/sau substituții) care conferă o activitate Fc modificată, de exemplu, scădere a uneia sau mai multor funcții efectoare ale Fc. Într-un caz, o proteină de fuziune ActRII (sau ALK4) cuprinde o secvență de aminoacizi așa cum este stabilit în formula A-B-C. De exemplu, porțiunea B este o polipeptidă ActRII (sau ALK4) trunchiată N- și C-terminal, de exemplu, așa cum este descris aici. Porțiunile A și C pot fi independent zero, unu sau mai mulți aminoacizi și ambele porțiuni A și C sunt heterologe față de B. Porțiunile A și/sau C pot fi atașate la porțiunea B printr-o secvență linker. În anumite cazuri, o proteină de fuziune ActRII (sau ALK4) cuprinde o secvență lider. Secvența lider poate fi o secvență lider ActRII (sau ALK4) nativă sau o secvență lider heterologă. În anumite cazuri, secvența lider este o secvență lider activatoare de plasminogen tisular (TPA) (de exemplu, SEQ ID NO: 34).

O polipeptidă ActRII sau polipeptidă ALK4, incluzând variante ale acestora, poate cuprinde o subsecvență de purificare, cum ar fi o etichetă epitop, o etichetă FLAG, o secvență de polistidină și o fuziune GST. Opțional, o polipeptidă ActRII sau polipeptidă ALK4 cuprinde unul sau mai multe resturi de aminoacizi modificați selectați dintre: un aminoacid glicozilat, un aminoacid PEGilat, un aminoacid farnesilat, un aminoacid acetilat, un aminoacid biotinilat și/sau un aminoacid conjugat cu o porțiune

lipidică. Polipeptidele ActRII și polipeptidele ALK4 pot cuprinde cel puțin un zahar legat de N și pot include două, trei sau mai multe zaharuri legate de N. Astfel de polipeptide pot cuprinde, de asemenea, zaharuri legate de O. În general, este de preferat ca polipeptidele ActRII și ALK4 să fie exprimate într-o linie celulară de mamifere care mediază glicozilarea naturală adecvată a polipeptidei, astfel încât să diminueze probabilitatea unui răspuns imun nefavorabil la un pacient. Polipeptidele ActRII și ALK4 pot fi produse într-o varietate de linii celulare care glicozilează proteina într-un mod adecvat pentru utilizarea la pacient, incluzând celule de insecte sau drojdii modificate prin inginerie și celule de mamifere, cum ar fi celule COS, celule CHO, celule HEK și celule NSO. În unele cazuri, o polipeptidă ActRII sau ALK4 este glicozilată și are un model de glicozilare susceptibil de a fi obținut dintr-o linie celulară de ovar de hamster chinezesc. În unele cazuri, polipeptidele ActRII sau ALK4 din dezvoltare prezintă un timp de înjumătățire serică cel puțin de 4, 6, 12, 24, 36, 48 sau 72 de ore la un mamifer (de exemplu, un șoarece sau un om). Opțional, polipeptidele ActRII sau ALK4 pot prezenta un timp de înjumătățire serică de cel puțin 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25 sau 30 de zile la un mamifer (de exemplu, un șoarece sau un om).

În anumite cazuri, dezvoltarea redă preparate farmaceutice care cuprind unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP din prezenta dezvoltare și un purtător acceptabil farmaceutic. Un preparat farmaceutic poate cuprinde, de asemenea, unul sau mai mulți agenți activi suplimentari, cum ar fi un compus care se utilizează pentru a trata hipertensiunea pulmonară, în special tratarea sau prevenirea uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare (de exemplu, proliferarea mușchiului neted și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară, angiogeneza în artera pulmonară, dispneea, durerile toracice, remodelarea vasculară pulmonară, hipertrofia ventriculară dreaptă și fibroza pulmonară) incluzând, de exemplu, vasodilatatoare precum prostaciclina, epoprostenolul și sildenafilul; antagoniști ai receptorilor de endotelină, cum ar fi bosentan; blocante ale canalelor de calciu precum amlodipina, diltiazemul și nifedipina; anticoagulante precum warfarina; diuretice; polipeptide BMP9; polipeptide BMP10; bardoxolon metil; și acid oleanolic. În general, preparatul farmaceutic va fi, de preferință, liber de pirogen (adică fără pirogen în măsura cerută de reglementările care guvernează calitatea produselor de uz terapeutic).

În anumite cazuri, atunci când se administrează un antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de antagoniști, conform dezvoltării pentru tulburările sau afecțiunile descrise aici, poate fi de dorit să se monitorizeze efectele asupra celulelor roșii din sânge în timpul administrării antagonistului de GDF/BMP sau să se determine sau să se ajusteze dozarea antagonistului de GDF/BMP, pentru a se reduce efectele nedorite asupra celulelor roșii din sânge. De exemplu, creșterea nivelului de celule roșii din sânge, a nivelului de hemoglobină sau a nivelului de hematocrit poate provoca creșteri nedorite ale tensiunii arteriale.

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP care trebuie utilizat în conformitate cu metodele și utilizările din dezvoltare este un anticorp sau o combinație de anticorpi. În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin de ActRII (ActRIIA și/sau ActRIIB). În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ActRII inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ActRII inhibă unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP, receptori de tip I sau co-receptori de la legarea la ActRII. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ActRII inhibă unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP de legarea la ActRII selectate din grupul format din: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10 și GDF3. În unele

cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la ALK4. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK4 inhibă semnalizarea ALK4, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK4 inhibă unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP, receptori de tip II sau co-receptori împotriva legării la ALK4. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK4 inhibă unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP împotriva legării la ALK4 selectată din grupul format din: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10 și GDF3. În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la ALK5. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK5 inhibă semnalizarea ALK5, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK5 inhibă unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP, receptori de tip II sau co-receptori împotriva legării la ALK5. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK5 inhibă unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP împotriva legării la o ALK5 selectată din grupul format din: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10 și GDF3. În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la ALK7. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK7 inhibă semnalizarea ALK7, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK7 inhibă unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP, receptori de tip II sau co-receptori împotriva legării la ALK7. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la ALK7 inhibă unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP împotriva legării la o ALK7 selectată din grupul format din: activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10 și GDF3. În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la GDF11. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la GDF11 inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la GDF11 inhibă legarea GDF11-ActRII și/sau legarea GDF11-ALK (de exemplu, legarea GDF11-ALK4, GDF11-ALK5 și/sau GDF11-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin de GDF8. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la GDF8 inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, cum ar fi cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la GDF8 inhibă legarea GDF8-ActRII și/sau legarea GDF8-ALK (de exemplu, legarea GDF8-ALK4, GDF8-ALK5 și/sau GDF8-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la BMP6. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la BMP6 inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la BMP6 inhibă legarea BMP6-ActRII și/sau legarea BMP6-ALK (de exemplu, legarea BMP6-ALK4, BMP6-ALK5 și/sau BMP6-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la BMP15. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la BMP15 inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la BMP15 inhibă legarea BMP15-ActRII și/sau legarea BMP15-ALK (de exemplu, legarea BMP15-ALK4, BMP15-ALK5 și/sau BMP15-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la GDF3. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la GDF3 inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la GDF3 inhibă legarea GDF3-ActRII și/sau legarea GDF3-ALK (de exemplu, legarea GDF3-ALK4, GDF3-ALK5 și/sau GDF3-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă cel puțin la BMP10. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la BMP10 inhibă semnalizarea ActRII,

opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la BMP10 inhibă legarea BMP10-ActRII și/sau legarea BMP10-ALK (de exemplu, legarea BMP10-ALK4, BMP10-ALK5 și/sau BMP10-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă la activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE). În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la activină (de exemplu activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE) inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la activină (de exemplu activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE) inhibă legarea activină-ActRII și/sau activină-ALK (de exemplu, legarea activină-ALK4, activină-ALK5 și/sau activină-ALK7). În unele cazuri, anticorpul se leagă la activina B. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la activina B inhibă semnalizarea ActRII, opțional măsurată într-o analiză pe bază de celule, precum cele descrise aici. În anumite cazuri, un anticorp care se leagă la activina B inhibă legarea activină B-ActRII și/sau legarea activină B-ALK (de exemplu, legarea activină B-ALK4, activină B-ALK5 și/sau activină B-ALK7). În unele cazuri, anticorpul este un anticorp multispecific sau o combinație de anticorpi multispecifici care se leagă la unul sau mai mulți dintre ActRIIB, ActRIIA, ALK4, ALK5, ALK7, GDF11, GDF8, activină, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15. În anumite cazuri, anticorpul multispecific, sau o combinație de anticorpi multispecifici, inhibă semnalizarea într-o analiză bazată pe celule a unuia sau mai multora dintre: ActRIIB, GDF11, GDF8, activină, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15. În unele cazuri, anticorpul este un anticorp himeric, un anticorp umanizat sau un anticorp uman. În unele cazuri, anticorpul este un anticorp cu un singur lanț, un fragment F(ab')₂, un diacorp cu un singur lanț, un fragment Fv cu un singur lanț în tandem, un diacorp cu un singur lanț în tandem, o sau o proteină de fuziune cuprinzând un diacorp cu un singur lanț și cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a lanțului greu de imunoglobulină.

În anumite cazuri, antagonistul de GDF/BMP este un inhibitor cu molecule mici sau o combinație de inhibitori cu molecule mici. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al ActRII (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB). În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al ALK4. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al ALK5. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al ALK7. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al GDF11. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al GDF8. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al BMP6. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al BMP15. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al BMP10. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al GDF3. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al activinei (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE). În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al activinei B. În unele cazuri, inhibitorul cu moleculă mică este un inhibitor cel puțin al uneia sau mai multor proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, antagonistul de GDF/BMP este un inhibitor al acidului nucleic sau o combinație de inhibitori ai acidului nucleic. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al ActRII (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB). În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al ALK4. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al ALK5. În unele cazuri,

inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al ALK7. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al GDF11. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al GDF8. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al BMP6. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al BMP15. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al BMP10. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al GDF3. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al activinei (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina AB, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și activina BE). În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al activinei B. În unele cazuri, inhibitorul de acid nucleic este un inhibitor cel puțin al unuia sau mai multor Smad-uri (de exemplu, Smad-urile 2 și 3).

În anumite cazuri, antagonistul GDF/BMP este o polipeptidă folistatină. În unele cazuri, polipeptida folistatină cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 26. În unele cazuri, polipeptida folistatină cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 27. În unele cazuri, polipeptida folistatină cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 28. În unele cazuri, polipeptida folistatină cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 29. În unele cazuri, polipeptida folistatină cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 30.

În anumite cazuri, antagonistul de GDF/BMP este o polipeptidă FLRG. În unele cazuri, polipeptida FLRG cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 31.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1 prezintă o aliniere a domeniilor extracelulare ale ActRIIB uman (SEQ ID NO: 2) și ActRIIA uman (SEQ ID NO: 10) cu reziduurile deduse aici, pe baza analizei compozite a mai multor structuri cristaline de ActRIIB și ActRIIA, pentru a contacta direct ligandul indicat cu cutii.

Figura 2 prezintă o aliniere a multiple secvențe a diferitelor proteine ActRIIB ale vertebratelor (SEQ ID NO: 53-58) și ActRIIA umană (SEQ ID NO: 59) precum și o secvență consens ActRII derivată din alinierea (SEQ ID NO: 60).

Figura 3 prezintă o aliniere a multiple secvențe a diferitelor proteine ActRIIA ale vertebratelor și ActRIIA umană (SEQ ID NO: 61-68).

Figura 4 prezintă o aliniere a multiple secvențe a domeniilor Fc din izotipurile IgG umane utilizând Clustal 2.1. Regiunile balama sunt indicate prin sublinierea cu linie punctată. Sublinierea dublă indică exemple de poziții proiectate în Fc IgG1 pentru a promova asocierea lanțului asimetric și pozițiile corespunzătoare față de alte izotipuri de IgG2, IgG3 și IgG4.

Figura 5 prezintă purificarea ActRIIA-hFc exprimată în celule CHO. Proteina se purifică ca un pic unic, bine definit, vizualizat prin dimensionarea coloanei (panoul

superior) și cu SDS-PAGE colorată Coomassie (panoul inferior) (banda stângă: standarde de greutate moleculară; banda dreaptă: ActRIIA-hFc).

Figura 6 prezintă legarea ActRIIA-hFc la activină (panoul superior) și GDF-11 (panoul inferior), măsurată prin testul Biacore™.

Figura 7 prezintă secvența completă de aminoacizi neprocesată a ActRIIB (25-131)-hFc (SEQ ID NO: 69). Liderul TPA (reziduurile 1-22) și domeniul extracelular ActRIIB dublu-trunchiat (reziduurile 24-131, utilizând numerotarea bazată pe secvența nativă din SEQ ID NO: 1) sunt fiecare subliniate. Este evidențiat glutamatul pus în evidență prin secvențiere ca fiind aminoacidul N-terminal al proteinei de fuziune mature, care se află în poziția 25 față de SEQ ID NO: 1

Figurile 8A și 8B prezintă o secvență de nucleotide care codifică ActRIIB (25-131)-hFc (firul de codare este prezentat în partea de sus, SEQ ID NO: 70 și complementul este prezentat în partea de jos 3'-5', SEQ ID NO: 71). Secvențele care codifică liderul TPA (nucleotidele 1-66) și domeniul extracelular ActRIIB (nucleotidele 73-396) sunt subliniate. Este prezentată de asemenea secvența de aminoacizi corespunzătoare pentru ActRIIB (25-131).

Figurile 9A și 9B prezintă o secvență de nucleotide alternativă care codifică ActRIIB (25-131)-hFc (firul de codare este prezentat în partea de sus, SEQ ID NO: 72 și complementul prezentat în partea de jos 3'-5', SEQ ID NO: 73). Această secvență conferă un nivel mai mare de exprimare a proteinelor în transformanții inițiali, făcând dezvoltarea liniei celulare un proces mai rapid. Secvențele care codifică liderul TPA (nucleotidele 1-66) și domeniul extracelular ActRIIB (nucleotidele 73-396) sunt subliniate și sunt evidențiate substituțiile din secvența nucleotidică de tip sălbatic a ECD (vezi Figura 8). Este prezentată, de asemenea, secvența de aminoacizi corespunzătoare pentru ActRIIB (25-131).

Figura 10 prezintă secvența completă de aminoacizi pentru capcana de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 74), inclusiv secvența lider TPA (subliniere dublă), domeniul extracelular ActRIIB (reziduurile 20-134 din SEQ ID NO: 1; subliniat cu o linie) și domeniul hFc. Aspartatul substituit la poziția 79 în secvența nativă este subliniat cu linie dublă și evidențiat, la fel ca și glicina dezvăluită prin secvențiere ca fiind reziduul N-terminal în proteina de fuziune matură.

Figurile 11A și 11B prezintă o secvență de nucleotide care codifică ActRIIB (L79D 20-134) -hFc. SEQ ID NO: 75 corespunde firului de sens și SEQ ID NO: 76 corespunde firului antisens. Liderul TPA (nucleotidele 1-66) este subliniat cu line dublă, iar domeniul extracelular ActRIIB (nucleotidele 76-420) este subliniat cu linie simplă.

Figura 12 prezintă secvența completă de aminoacizi pentru capcana de GDF trunchiată ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 77), incluzând liderul TPA (subliniere cu linie dublă), domeniul extracelular ActRIIB trunchiat (resturile 25-131 din SEQ ID NO: 1; subliniere cu linie simplă), și domeniul hFc. Aspartatul substituit la poziția 79 în secvența nativă este subliniat cu linie dublă și evidențiat, la fel ca glutamatul dezvăluit prin secvențiere ca fiind reziduul N-terminal în proteina de fuziune matură.

Figura 13 prezintă secvența de aminoacizi pentru capcana GDF trunchiată ActRIIB (L79D 25-131)-hFc fără un lider (SEQ ID NO: 78). Domeniul extracelular ActRIIB trunchiat (reziduurile 25-131 din SEQ ID NO: 1) este subliniat. Aspartatul substituit la poziția 79 în secvența nativă este subliniat cu linie dublă și evidențiat, la fel ca glutamatul pus în evidență prin secvențiere ca fiind reziduul N-terminal din proteina de fuziune matură.

Figura 14 prezintă secvența de aminoacizi pentru capcana de GDF trunchiată ActRIIB (L79D 25-131) fără lider, domeniul hFc și linkerul (SEQ ID NO: 79). Aspartatul substituit

la poziția 79 în secvența nativă este subliniat și evidențiat, la fel ca glutamatul pus în evidență prin secvențiere ca fiind reziduul N-terminal din proteina de fuziune matură.

Figurile 15A și 15B prezintă o secvență de nucleotide care codifică ActRIIB (L79D 25-131) -hFc. SEQ ID NO: 80 corespunde firului de sens și SEQ ID NO: 81 corespunde firului antisens. Liderul TPA (nucleotidele 1-66) este subliniat cu linie dublă, și domeniul extracelular ActRIIB trunchiat (nucleotidele 76-396) este subliniat cu linie simplă. Este prezentată, de asemenea, secvența de aminoacizi pentru domeniul extracelular ActRIIB (reziduurile 25-131 din SEQ ID NO: 1).

Figurile 16A și 16B prezintă o secvență de nucleotide alternativă care codifică ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 82 corespunde firului de sens și SEQ ID NO: 83 corespunde firului antisens. Liderul TPA (nucleotidele 1-66) este subliniat cu linie dublă, domeniul extracelular ActRIIB trunchiat (nucleotidele 76-396) este subliniat, și substituțiile în secvența de nucleotide de tip sălbatic din domeniul extracelular sunt sublinate cu linie dublă și evidențiate (comparativ cu SEQ ID NO: 81, Figura 15). Este prezentată, de asemenea, secvența de aminoacizi pentru domeniul extracelular ActRIIB (reziduurile 25-131 din SEQ ID NO: 1).

Figura 17 prezintă nucleotidele 76-396 (SEQ ID NO: 84) din secvența alternativă de nucleotide prezentată în Figura 16 (SEQ ID NO: 82). Aceleași substituții de nucleotide indicate în Figura 16 sunt, de asemenea sublinate și evidențiate aici. SEQ ID NO: 84 codifică numai domeniul extracelular ActRIIB trunchiat (corespunzător reziduurilor 25-131 din SEQ ID NO: 1) cu o substituție L79D, de exemplu, ActRIIB (L79D 25-131).

Figura 18 prezintă o aliniere de multiple secvențe a diferitelor proteine ALK4 pentru vertebrate și ALK4 umane (SEQ ID NO: 126-132).

Figura 19 prezintă date comparative de legare a ligandului pentru un complex proteic heterodimeric ALK4-Fc:ActRIIB-Fc comparativ cu homodimerul ActRIIB-Fc și homodimerul ALK4-Fc. Pentru fiecare complex proteic, liganzii sunt clasificați după k_{off} , o constantă cinetică care se corelează bine cu inhibarea semnalizării ligandului și listată în ordinea descrescătoare a afinității de legare (liganzii legați cel mai strâns sunt listați în partea de sus). În stânga, liniile galbene, roșii, verzi și albastre indică magnitudinea constantei off-rate. Liniile negre solide indică liganzi a căror legare la heterodimer este îmbunătățită sau neschimbată în comparație cu homodimerul, în timp ce liniile roșii punctate indică legarea substanțial redusă în comparație cu homodimerul. Așa cum se arată, heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc prezintă o legare îmbunătățită la activina B în comparație cu oricare homodimer, păstrează o legare puternică la activina A, GDF8 și GDF11, așa cum se observă cu homodimerul ActRIIB-Fc și prezintă o legare substanțial redusă la BMP9, BMP10 și GDF3. La fel ca homodimerul ActRIIB-Fc, heterodimerul păstrează legarea de BMP6 la un nivel intermediar.

Figura 20 prezintă comparativ datele IC_{50} pentru heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc/homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc determinate printr-o analiză de gene raportor A-204, așa cum este descris aici. Heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc inhibă căile de semnalizare ale activinei A, activinei B, GDF8 și GDF11 similar cu homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Cu toate acestea, inhibarea de către heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc a căilor de semnalizare BMP9 și BMP10 este semnificativ redusă în comparație cu cea de către homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Aceste date demonstrează că heterodimerii ALK4:ActRIIB sunt antagoniști mai selectivi ai activinei A, activinei B, GDF8 și GDF11 în comparație cu homodimerii ActRIIB:ActRIIB corespunzători.

Figurile 21A și 21B prezintă două exemple schematice de complexe de proteine heteromerică care cuprind polipeptide de receptor de tip I și de receptor de tip II. Figura 21A ilustrează un complex proteic heterodimeric care cuprinde o polipeptidă de fuziune

a receptorului de tip I și o polipeptidă de fuziune a receptorului de tip II, care poate fi asamblată covalent sau necovalent printr-un domeniu de multimerizare conținut în fiecare lanț polipeptidic. Două domenii de multimerizare asamblate constituie o pereche de interacțiune, care poate fi ghidată, fie neghidată. Figura 21B descrie un complex proteic heterotetrameric cuprinzând doi complecși heterodimerici așa cum este ilustrat în Figura 21A. Se pot preconiza complecși de ordin superior.

Figurile 22 prezintă un exemplu schematic al unui complex proteic heteromeric care cuprinde o polipeptidă a receptorului de tip I (indicată ca "I") (de exemplu, o polipeptidă care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu un domeniu extracelular al unei proteine ALK4 de la oameni sau alte specii precum cele descrise aici) și o polipeptidă a receptorului de tip II (indicată ca "II") (de exemplu, o polipeptidă care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu un domeniu extracelular al unei proteine ActRIIB de la oameni sau alte specii ca cele descrise aici). În exemplele ilustrate, polipeptida receptorului de tip I face parte dintr-o polipeptidă de fuziune care cuprinde un prim membru al unei perechi de interacțiune ("C₁"), și polipeptida receptorului de tip II face parte dintr-o polipeptidă de fuziune care cuprinde un al doilea membru al unei perechi de interacțiune ("C₂"). În fiecare polipeptidă de fuziune, poate fi poziționat un linker între polipeptida receptorului de tip I sau tip II și membrul corespunzător al perechii de interacțiune. Primul și al doilea membru al perechii de interacțiune pot fi o pereche ghidată (asimetrică), ceea ce înseamnă că membrii perechii se asociază preferențial între ei, mai degrabă decât să se auto-asocieze, sau perechea de interacțiune poate fi neghidată, ceea ce înseamnă că membrii perechii se pot asocia între ei sau se pot asocia fără preferințe substanțiale și pot avea aceleași sau diferite secvențe de aminoacizi. Proteinele de fuziune Fc tradiționale și anticorpii sunt exemple de perechi de interacțiuni neghidate, în timp ce o varietate de domenii Fc proiectate au fost concepute ca perechi de interacțiuni ghidate (asimetrice) [de exemplu, Spiess și colab (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106].

Figurile 23A-23D prezintă exemple schematice de complecși de proteine heteromerică care conțin o polipeptidă ALK4 (de exemplu, o polipeptidă care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu un domeniu extracelular al unei proteine ALK4 de la oameni sau alte specii precum cele descrise aici) și o polipeptidă ActRIIB (de exemplu, o polipeptidă care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu un domeniu extracelular al unei proteine ActRIIB de la oameni sau alte specii precum cele descrise aici). În exemplele ilustrate, polipeptida ALK4 face parte dintr-o polipeptidă de fuziune care cuprinde un prim membru al unei perechi de interacțiune ("C₁"), iar polipeptida ActRIIB face parte dintr-o polipeptidă de fuziune care cuprinde un al doilea membru al unei perechi de interacțiune ("C₂"). Perechile de interacțiune adecvate includ, de exemplu, perechi de interacțiune cu lanțul greu și/sau cu lanțul ușor de imunoglobulină, trunchieri și variante ale acestora, cum ar fi cele descrise aici [de exemplu, Spiess și colab (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. În fiecare polipeptidă de fuziune, poate fi poziționat un linker între polipeptida ALK4 sau ActRIIB și membrul corespunzător al perechii de interacțiune. Primul și al doilea membru al perechii de interacțiune pot fi neghidate, ceea ce înseamnă că membrii perechii se pot asocia între ei sau se pot auto-asocia fără preferințe substanțiale și pot avea aceleași sau diferite secvențe de aminoacizi. Vezi Figura 23A. Alternativ, perechea de interacțiune poate fi o pereche ghidată (asimetrică), ceea ce înseamnă că membrii perechii se asociază preferențial între ei, mai degrabă decât să

se auto-asociază. Vezi Figura 23B. Se pot preconiza complecși de ordin superior. Vezi Figura 23C și 23D.

DESCRIEREA DETALIATA

1. Prezentare generală

Superfamilia TGF- β este formată din peste 30 de factori secretați, inclusiv TGF-beta-uri, activine, nodali, proteine morfogenetice osoase (BMP-uri), factori de creștere și diferențiere (GDF-uri) și hormon anti-mulerian (AMH) [Weiss și colab. (2013) *Developmental Biology*, 2(1): 47-63]. Membrii superfamiliei, care se găsesc atât la vertebrate, cât și la nevertebrate, sunt exprimați omniprezent în diverse țesuturi și funcționează în primele etape de dezvoltare pe parcursul vieții unui animal. Desigur, proteinele superfamiliei TGF- β sunt mediatori cheie pentru autoînnoirea celulelor stem, gastrulării, diferențierii, morfogenezei organelor și homeostaziei țesutului adult. În concordanță cu această activitate omniprezentă, semnalizarea aberantă a superfamiliei TGF-beta este asociată cu o gamă largă de patologii umane, inclusiv, de exemplu, boli autoimune, boli cardiovasculare, boli fibrotice și cancer.

Liganzii superfamiliei TGF-beta împărtășesc aceeași structură dimerică în care întoarcerea de $3-1/2$ a elicei centrale a unui monomer se împachetează pe suprafața concavă formată din catena beta a celuilalt monomer. Majoritatea membrilor familiei TGF-beta sunt stabili în plus printr-o legătură intermoleculară disulfidică. Aceste legături disulfidice traversează printr-un inel format din alte două legături disulfidice generând ceea ce a fost numit motivul de 'nod de cisteină' [Lin și colab. (2006) *Reproduction* 132: 179-190; și Hinck și colab. (2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870].

Semnalizarea superfamiliei TGF-beta este mediată de complecși heteromerici de receptori tip I și tip II de serină/treonină kinază, care fosforilează și activează proteinele SMAD din aval (*de exemplu*, Proteinele SMAD 1, 2, 3, 5 și 8) la stimularea ligandului [Massagué (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178]. Acești receptori de tip I și de tip II sunt proteine transmembranare, compuse dintr-un domeniu extracelular care leagă ligandul cu regiune bogată în cisteină, un domeniu transmembranar și un domeniu citoplasmatic cu specificitatea prezisă a serinei/treonin kinazei. În general, receptorii de tip I mediază semnalizarea intracelulară, în timp ce receptorii de tip II sunt necesari pentru legarea liganzilor superfamiliei TGF-beta. Receptorii de tip I și II formează un complex stabil după legarea ligandului, rezultând fosforilarea receptorilor de tip I de către receptorii de tip II.

Familia TGF-beta poate fi împărțită în două ramuri filogenetice pe baza receptorilor de tip I pe care îi leagă și a proteinelor Smad pe care le activează. Una este ramura evoluată mai recent, care include, *de exemplu*, TGF-beta-uri, activine, GDF8, GDF9, GDF11, BMP3 și nodal, care semnalizează prin receptorii de tip I care activează Smad-urile 2 și 3 [Hinck (2012) *FEBS Letters* 586:1860-1870]. Cealaltă ramură cuprinde proteinele mai înrudite mai îndepărtate ale superfamiliei și include, *de exemplu*, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF1, GDF5, GDF6 și GDF7, care semnalizează prin Smad-uri 1, 5 și 8.

Activinele sunt membre ale superfamiliei TGF-beta și au fost descoperite inițial ca agenți de reglare a secreției hormonului de stimulare a foliculului, dar ulterior au fost caracterizate diferite roluri reproductive și nereproductive. Există trei forme principale de activină (A, B și AB) care sunt homo/heterodimeri ai două subunități β strâns înrudite ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ și respectiv $\beta_A\beta_B$). Genomul uman codifică, de asemenea, o activină C și o activină E, care sunt exprimate în principal în ficat, și sunt, de asemenea, cunoscute forme heterodimere care conțin β_C sau β_E . În superfamilia TGF-beta, activinele sunt factori unici și multifuncționali care pot stimula producția de hormoni în celulele ovariene și placentare, susține supraviețuirea celulelor neuronale, influența progresul

ciclului celular pozitiv sau negativ în funcție de tipul celulei și induce diferențierea mezodermică cel puțin la embrioni de amfibieni [DePaolo și *colab.* (1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson și *colab.* (1997) Curr Biol. 7:81-84; și Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]. În mai multe țesuturi, semnalizarea activinei este antagonizată de heterodimerul său înrudit, inhibina. De exemplu, în reglarea secreției hormonului de stimulare a foliculului (FSH) din hipofiză, activina promovează sinteza și secreția FSH, în timp ce inhibina reduce sinteza și secreția FSH. Alte proteine care pot regla bioactivitatea activinei și/sau se leagă la activină includ folistatina (FS), proteina asociată cu folistatina (FSRP, cunoscută și sub numele de FLRG sau FSTL3) și α_2 -macroglobulina.

Așa cum este descris aici, agenții care se leagă la "activina A" sunt agenți care se leagă specific la subunitatea β_A , fie în contextul unei subunități β_A izolate fie ca un complex dimeric (*de exemplu*, un homodimer $\beta_A\beta_A$ sau un heterodimer $\beta_A\beta_B$). În cazul unui complex heterodimeric (*de exemplu*, un heterodimer $\beta_A\beta_B$), agenții care se leagă la "activina A" sunt specifici epitopilor prezenți în subunitatea β_A , dar nu se leagă la epitopii prezenți în subunitatea non- β_A a complexului (*de exemplu*, subunitate β_B a complexului). Similar, agenții dezvăluiți aici care antagonizează (inhibă) "activina A" sunt agenți care inhibă una sau mai multe activități mediate de o subunitate β_A , fie în contextul unei subunități β_A izolate fie ca un complex dimeric (*de exemplu*, un homodimer $\beta_A\beta_A$ sau un heterodimer $\beta_A\beta_B$). În cazul heterodimerilor $\beta_A\beta_B$, agenții care inhibă "activina A" sunt agenți care inhibă specific una sau mai multe activități ale subunității β_A , dar nu inhibă activitatea subunității non- β_A a complexului (*de exemplu*, subunitate β_B a complexului). Acest principiu se aplică și agenților care se leagă la și/sau inhibă "activina B", "activina C" și "activina E". Agenții dezvăluiți aici care antagonizează "activina AB" sunt agenți care inhibă una sau mai multe activități mediate de subunitatea β_A și una sau mai multe activități mediate de subunitatea β_B .

BMP-urile și GDF-urile formează împreună o familie de citokine cu nod de cisteină care au în comun pliul caracteristic al superfamiliei TGF-beta [Rider și *colab.* (2010) Biochem J., 429(1):1-12]. Această familie include, de exemplu, BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP2a, BMP3, BMP3b (cunoscut de asemenea ca GDF10), BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP8a, BMP8b, BMP9 (cunoscut de asemenea ca GDF2), BMP10, BMP11 (cunoscut de asemenea ca GDF11), BMP12 (cunoscut de asemenea ca GDF7), BMP13 (cunoscut de asemenea ca GDF6), BMP14 (cunoscut de asemenea ca GDF5), BMP15, GDF1, GDF3 (cunoscut de asemenea ca VGR2), GDF8 (cunoscut de asemenea ca miostatina), GDF9, GDF15, și decapentaplegic. Pe lângă capacitatea de a induce formarea osoasă, care a dat numele BMP, BMP/GDF prezintă activități morfogenetice în dezvoltarea unei game largi de țesuturi. Homo- și hetero-dimerii BMP/GDF interacționează cu combinații de dimeri ai receptorilor de tip I și tip II pentru a produce multipli complecși de semnalizare posibile, care conduc la activarea unuia dintre cele două seturi concurente de factori de transcripție SMAD. BMP/GDF-urile au funcții deosebit de specifice și localizate. Acestea sunt reglate în mai multe moduri, inclusiv restricția de dezvoltare a exprimării BMP/GDF și prin secreția mai multor proteine antagoniste specifice pentru BMP care se leagă cu afinitate mare la citokine. Curios, un număr dintre acești antagoniști seamănă cu liganzii superfamiliei TGF-beta.

Factorul de creștere și diferențiere-8 (GDF8) este, de asemenea, cunoscut sub numele de miostatina. GDF8 este un agent de reglare negativ al masei musculare scheletice și este deosebit de exprimat în mușchii scheletici în curs de dezvoltare și la adulți. Mutația nulă GDF8 la șoarecii transgenici se caracterizează printr-o hipertrofie marcată și o hiperplazie a mușchilor scheletici [McPherron și *colab.* Nature (1997)

387:83-90]. Creșteri similare ale masei musculare scheletice sunt evidente în mutațiile naturale ale GDF8 la bovine și, izbitor, la oameni [Ashmore *și colab.* (1974) *Growth*, 38:501-507; Swatland și Kieffer, J. *Anim. Sci.* (1994) 38:752-757; McPherron și Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:12457-12461; Kambadur *și colab.* *Genome Res.* (1997) 7:910-915; și Schuelke *și colab.* (2004) *N Engl J Med*, 350:2682-8]. Studiile au arătat, de asemenea, că pierderea musculară asociată cu infecția cu HIV la om este însoțită de creșteri ale exprimării proteinei GDF8 [Gonzalez-Cadavid *și colab.*, *PNAS* (1998) 95:14938-43]. În plus, GDF8 poate modula producția de enzime musculare specifice (*de exemplu*, creatin kinază) și modulează proliferarea celulelor mioblaste [Publicația cererii internaționale de brevet nr. WO 00/43781]. Propeptida GDF8 se poate lega necovalent la dimerul matur al domeniului GDF8, inactivând activitatea sa biologică [Miyazono *și colab.* (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield *și colab.* (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654; și Brown *și colab.* (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43]. Alte proteine care se leagă la GDF8 sau proteine înrudite structural și inhibă activitatea lor biologică includ folistatina și, potențial, proteinele legate de folistatină [Gamer *și colab.* (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232].

GDF11, cunoscut și sub numele de BMP11, este o proteină secretată care se exprimă în mugurul cozii, mugurul membrilor, arcadele maxilare și mandibulare și ganglionii rădăcinii dorsale în timpul dezvoltării șoarecilor [McPherron *și colab.* (1999) *Nat. Genet.*, 22: 260-264; și Nakashima *și colab.* (1999) *Mech. Dev.*, 80: 185-189]. GDF11 joacă un rol unic în modelarea atât a țesuturilor mezodermice, cât și a țesuturilor neuronale [Gamer *și colab.* (1999) *Dev Biol.*, 208:222-32]. GDF11 s-a dovedit a fi un agent de reglare negativ al condrogenezei și miogenezei în dezvoltarea membrului puiului [Gamer *și colab.* (2001) *Dev Biol.*, 229:407-20]. Expresia GDF11 în mușchi sugerează, de asemenea, rolul său în reglarea creșterii musculare, similar cu GDF8. În plus, expresia GDF11 în creier sugerează că GDF11 poate avea și activități în legătură cu funcția sistemului nervos. Interesant este că, s-a constatat că GDF11 inhibă neurogeneza în epiteliul olfactiv [Wu *și colab.* (2003) *Neuron.*, 37:197-207]. Prin urmare, GDF11 poate avea aplicații *in vitro* și *in vivo* în tratamentul bolilor precum bolile musculare și bolile neurodegenerative (*de exemplu*, scleroza laterală amiotrofică).

Așa cum s-a demonstrat aici, o polipeptidă ActRIIA solubilă și heterodimerul ALK4:ActRIIB, care se leagă la diferiți liganzi care interacționează cu ActRIIA și ActRIIB, este eficientă în scăderea presiunii sanguine și a hipertrofiei cardiace într-un model de PAH. Deși nu se dorește legarea de vreun mecanism particular, este de așteptat ca efectele acestor agenți să fie cauzate, în principal, de un efect antagonist de semnalizare a ActRIIA/B. Indiferent de mecanism, din datele prezentate aici rezultă că antagoniștii de semnalizare ai ActRIIA/B (antagoniști de GDF/BMP) scad tensiunea arterială, scad hipertrofia cardiacă și au alte efecte de pozitive în tratarea hipertensiunii pulmonare. Trebuie remarcat faptul că presiunea sanguină și hipertrofia sunt dinamice, cu modificări dependente de un echilibru al factorilor care cresc presiunea sanguină și hipertrofia și al factorilor care scad presiunea sanguină și hipertrofia. Presiunea sanguină și hipertrofia cardiacă pot fi scăzute prin creșterea factorilor care reduc presiunea sanguină și hipertrofia cardiacă, scăderea factorilor care promovează presiunea sanguină crescută și hipertrofia cardiacă sau ambii. Termenii de scădere a presiunii sanguine sau scădere a hipertrofiei cardiace se referă la modificările fizice observabile ale presiunii sanguine și ale țesutului cardiac și sunt menite să fie neutre în ceea ce privește mecanismul prin care apar modificările.

Modelele de șobolani pentru PAH care au fost utilizate în studiile descrise aici sunt considerate a fi predictive pentru eficacitatea la om și, prin urmare, această dezvoltare oferă metode de utilizare a polipeptidelor ActRIIA, heteromultimerilor

ALK4:ActRIIB și a altor antagoniști de GDF/BMP pentru tratarea hipertensiunii pulmonare (de exemplu, PAH), în special tratarea, prevenirea sau reducerea severității sau duratei uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare, la om. După cum este dezvăluit aici, termenul antagoniști de GDF/BMP se referă la o varietate de agenți care pot fi utilizați pentru a antagoniza semnalizarea ActRIIA/B incluzând, de exemplu, antagoniști care inhibă unul sau mai mulți liganzi de ActRIIA/B [de exemplu, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina AC, activina BC, activina E, activina AE și/sau activina BE), GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10]; antagoniști care inhibă unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK7 și ALK5); și antagoniști care inhibă una sau mai multe componente de semnalizare în aval (de exemplu, proteine Smad cum ar fi Smad-urile 2 și 3). Antagoniștii de GDF/BMP care trebuie utilizați în conformitate cu metodele și utilizările din dezvoltare includ o varietate de forme, de exemplu, capcane pentru liganzi (de exemplu, polipeptide ActRIIA solubile, polipeptide ActRIIB, heterodimeri ALK4:ActRIIB, polipeptide folistatinice și polipeptide FLRG), antagoniști ai anticorpilor (de exemplu, anticorpi care inhibă unul sau mai mulți dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK7 și ALK5), antagoniști cu molecule mici [de exemplu, molecule mici care inhibă unul sau mai multe dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK7, ALK5 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3)] și antagoniști nucleotidici [de exemplu, secvențe nucleotidice care inhibă una sau mai multe dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK7, ALK5 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3)].

Termenii utilizați în această specificație au în general semnificațiile lor obișnuite în domeniu, în contextul acestei dezvoltări și în contextul specific în care se utilizează fiecare termen. Anumiți termeni sunt discutați mai jos sau în altă parte în specificație pentru a oferi o îndrumare suplimentară practicianului în descrierea compozițiilor și metodelor conform dezvoltării și referitor la cum să le realizăm și să le folosim. Scopul sau semnificația oricărei utilizări a unui termen va fi evident din contextul specific în care este utilizat.

"Omolog", în toate formele sale gramaticale și variațiile de ortografie, se referă la relația dintre două proteine care posedă o "origine evolutivă comună", inclusiv proteine din superfamilii din aceeași specie de organism, precum și proteine omoloage din diferite specii de organism. Astfel de proteine (și acizii lor nucleici de codificare) au omologie de secvență, reflectată de similitudinea lor de secvență, fie în termeni de identitate procentuală, fie prin prezența unor reziduuri sau motive specifice și poziții conservate. Cu toate acestea, în utilizarea obișnuită și în prezenta cerere, termenul "omolog", atunci când este modificat cu un adverb precum "ridicat", se poate referi la similitudinea secvenței și se poate referi sau nu la o origine evolutivă comună.

Termenul "similitudine de secvență", în toate formele sale gramaticale, se referă la gradul de identitate sau corespondență între secvențele de acid nucleic sau de aminoacizi care pot avea sau nu o origine evolutivă comună.

"Identitatea procentuală (%) a secvenței" față de o secvență de polipeptidă (sau nucleotidă) de referință este definită ca fiind procentul de reziduuri de aminoacizi (sau acizi nucleici) dintr-o secvență candidată care sunt identice cu reziduurile de aminoacizi (sau acizii nucleici) din secvența de polipeptidă de referință (nucleotidă), după alinierea secvențelor și introducerea golurilor, dacă este necesar, pentru a se atinge identitatea procentuală maximă a secvenței și fără a lua în considerare orice substituții conservative ca parte a identității secvenței. Alinierea în scopul determinării

procentului de identitate a secvenței de aminoacizi poate fi efectuată în diferite moduri care se încadrează în competențele în domeniu, de exemplu, utilizând software de calculator disponibil public, cum ar fi software-ul BLAST, BLAST-2, ALIGN sau Megalign (DNASTAR). Specialiștii în domeniu pot determina parametrii adecvați pentru alinierea secvențelor, incluzând orice algoritmi necesari pentru a se obține alinierea maximă pe toată lungimea secvențelor comparate. Pentru scopurile de aici, totuși, valorile identității secvenței % de aminoacizi (acid nucleic) sunt generate folosind programul de calculator ALIGN-2 de comparație a secvenței. Programul de calculator de comparare a secvențelor ALIGN-2 a fost creat de Genentech, Inc., iar codul sursă a fost depus cu documentația pentru utilizator la U.S Copyright Office, Washington D.C., 20559, unde este înregistrat sub numărul de înregistrare al drepturilor de autor din SUA TXU510087. Programul ALIGN-2 este disponibil public de la Genentech, Inc., South San Francisco, California sau poate fi compilat din codul sursă. Programul ALIGN-2 ar trebui compilat pentru a fi utilizat pe un sistem de operare UNIX, inclusiv digital UNIX V4.0D. Toți parametrii de comparație a secvenței sunt setați de programul ALIGN-2 și nu variază.

"Agoniza", în toate formele sale gramaticale, se referă la procesul de activare a unei proteine și/sau a unei gene (*de exemplu*, prin activarea sau amplificarea exprimării genei respectivei proteine sau prin inducerea unei proteine inactive să intre într-o stare activă) sau creșterea activității unei proteine și/sau a unei gene.

"Antagoniza", în toate formele sale gramaticale, se referă la procesul de inhibare a unei proteine și/sau a unei gene (de exemplu, prin inhibarea sau scăderea exprimării genei acelei proteine sau prin inducerea unei proteine active să intre într-o stare inactivă) sau scăderea activității unei proteine și/sau a unei gene.

Termenii "în jur de" și "aproximativ" folosiți în legătură cu o valoare numerică în întreaga descriere și revendicări denotă un interval de acuratețe, familiar și acceptabil pentru o persoană de specialitate în domeniu. În general, un astfel de interval de acuratețe este de $\pm 10\%$. Alternativ, și în special în sistemele biologice, termenii "în jur de" și "aproximativ" pot însemna valori care se află într-un ordin de mărime, de preferință ≤ 5 ori și mai preferabil ≤ 2 ori dintr-o valoare dată.

Intervalele numerice dezvăluite aici includ numerele care definesc intervalele.

Termenii "un" și "o" includ referiri la plural, cu excepția cazului în care contextul în care se utilizează termenul dictează clar altfel. Termenii "un" (sau "o"), precum și termenii "unul sau mai mulți" și "cel puțin unul" pot fi utilizați aici în mod interschimbabil. Mai mult, "și/sau", în cazul în care se utilizează aici, trebuie considerat ca dezvăluire specifică a fiecăreia dintre cele două sau mai multe caracteristici sau componente specificate cu sau fără cealaltă. Astfel, termenul "și/sau" așa cum se utilizează într-o frază precum "A și/sau B" aici este destinat să includă "A și B", "A sau B", "A" (singur) și "B" (singur). La fel, termenul "și/sau" așa cum se utilizează într-o frază precum "A, B și/sau C" este destinat să cuprindă fiecare dintre următoarele cazuri: A, B și C; A, B sau C; A sau C; A sau B; B sau C; A și C; A și B; B și C; A (singur); B (singur); și C (singur).

Pe parcursul acestei dezvăluiri, cuvântul "cuprind" sau variații precum "cuprinde" sau "cuprinzând" va fi înțeles ca implicând includerea unui număr întreg sau grupuri de numere întregi, dar nu excluderea oricărui alt număr întreg sau grup de numere întregi.

2. Polipeptide ActRII, polipeptide ALK4, heteromultimeri ALK4:ActRIIB și variante ale acestora

În anumite cazuri, dezvăluirea se referă la polipeptide ActRII și utilizări ale acestora (de exemplu, pentru tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare

și/sau a severității hipertensiunii pulmonare sau a uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare) și/sau a unei boli pulmonare interstițiale (de exemplu, fibroză pulmonară idiopatică). Așa cum se utilizează aici, termenul "ActRII" se referă la familia receptorilor de activină de tip II. Această familie include receptorul activinei de tip IIA (ActRIIA) și receptorul de activină de tip IIB (ActRIIB).

Așa cum se utilizează aici, termenul "ActRIIB" se referă la o familie de proteine de receptor activină tip IIB (ActRIIB) din orice specie și variante derivate din astfel de proteine ActRIIB prin mutageneză sau altă modificare. Referirea la ActRIIB de aici este înțeleasă a fi o referire la oricare dintre formele identificate în prezent. Membrii familiei ActRIIB sunt în general proteine transmembranare, compuse dintr-un domeniu extracelular care leagă un ligand cuprinzând o regiune bogată în cisteină, un domeniu transmembranar și un domeniu citoplasmatic cu activitate prezisă cu serin/treonin kinaza.

Termenul "polipeptidă ActRIIB" include polipeptide care cuprind orice polipeptidă naturală a unui membru al familiei ActRIIB precum și orice variante ale acestuia (inclusiv mutații, fragmente, fuziuni și forme peptidomimetice) care păstrează o activitate utilă. Exemple de astfel de variante de polipeptide ActRIIB sunt furnizate pe parcursul prezentei dezvăluiri, precum și în publicațiile cererilor de brevet nr. WO 2006/012627, WO 2008/097541, WO 2010/151426, și WO 2011/020045. Numerotarea aminoacizilor pentru toate polipeptidele în legătură cu ActRIIB descrise aici se bazează pe numerotarea secvenței de proteină precursoră a ActRIIB umană redată mai jos (SEQ ID NO: 1), cu excepția cazului în care este specificat altfel.

Secvența de proteină precursoră de ActRIIB umană este după cum urmează:

```

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

```

Peptida semnal este indicată prin sublinierea cu o linie simplă; domeniul extracelular este indicat prin litere **aldine**; iar potențiale situsuri de glicozilare endogene legate de N- sunt indicate cu prin sublinierea cu linie dublă.

Secvența de polipeptidă ActRIIB extracelulară (matură) procesată este după cum urmează:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLD
DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID
NO: 2).

```

În unele cazuri, proteina poate fi produsă cu o secvență "SGR..." la capătul N-terminal. "Coda" C-terminală a domeniului extracelular este indicată prin sublinierea

cu o linie simplă. Secvența cu "coada" deletată (o secvență $\Delta 15$) este după cum urmează:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD

FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3).

O formă de ActRIIB cu o alanină în poziția 64 din SEQ ID NO: 1 (A64) este, de asemenea, raportată în literatura de specialitate. Vezi, *de exemplu*, Hilden și colab. (1994) Blood, 83(8): 2163-2170. Solicitanții au determinat faptul că o proteină de fuziune ActRIIB-Fc care cuprinde un domeniu extracelular al ActRIIB cu substituția A64 are o afinitate relativ scăzută pentru activină și GDF11. Prin contrast, aceeași proteină de fuziune ActRIIB-Fc cu o arginină în poziția 64 (R64) are o afinitate pentru activină și GDF11 în intervalul nanomolar scăzut la picomolar ridicat. Prin urmare, în această dezvoltare secvențele cu un R64 sunt utilizate ca secvența de referință "de tip sălbatic" pentru ActRIIB uman.

Forma ActRIIB cu o alanină în poziția 64 este după cum urmează:

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

Peptida semnal este indicată prin sublinierea cu o linie simplă iar domeniul extracelular este indicat prin litere **aldine**.

Secvența de polipeptidă ActRIIB extracelulară procesată (matură) a formei alternative A64 este după cum urmează:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSTGTIELVKKGCWLDD

FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 5)

În unele cazuri, proteina poate fi produsă cu o secvență "SGR..." la capătul N-terminal. "Coada" C-terminală al domeniului extracelular este indicată prin sublinierea cu o linie simplă. Secvența cu "coada" deletată (o secvență $\Delta 15$) este după cum urmează:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSTGTIELVKKGCWLDD

FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 6)

O secvență de acid nucleic care codifică proteina precursoră de ActRIIB uman este prezentată mai jos (SEQ ID NO: 7), reprezentând nucleotidele 25-1560 din secvența de referință Genbank NM_001106.3 care codifică aminoacizii 1-513 din precursorul de ActRIIB. Secvența așa cum este arătat prezintă o arginină în poziția 64 și poate fi modificată pentru a prezenta în schimb o alanină. Secvența semnal este subliniată.

1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
 51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
 101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
 151 GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCGG ACAGCCCCCA
 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG 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 TGCCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG
 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)

O secvență de acid nucleic care codifică polipeptida ActRIIB umană extracelulară procesată este după cum urmează (SEQ ID NO: 8). Secvența așa cum se arată prezintă o arginină în poziția 64 și poate fi modificată pentru a prezenta în schimb o alanină.

```

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGC GCAACAG CTCTGGCACC
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATT GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC

```

(SEQ ID NO: 8)

O aliniere a secvențelor de aminoacizi a domeniului extracelular al ActRIIB uman și a domeniului extracelular al ActRIIA uman sunt ilustrate în Figura 1. Această aliniere indică reziduurile de aminoacizi din ambii receptori despre care se crede că intră în contact direct cu liganzii de ActRII. De exemplu, structurile compuse ActRII au indicat că buzunarul de legare a ligandului ActRIIB este definit, parțial, de reziduurile Y31, N33, N35, L38 până la T41, E47, E50, Q53 până la K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 până la N83, Y85, R87, A92 și E94 până la F101. În aceste poziții, este de așteptat ca mutațiile conservative să fie tolerate.

În plus, ActRIIB este bine conservat printre vertebrate, cu întinderi mari din domeniul extracelular complet conservat. De exemplu, Figura 2 ilustrează o aliniere a mai multor secvențe a unui domeniu extracelular ActRIIB uman comparativ cu diferiți ortologi ActRIIB. Mulți dintre liganzii care se leagă la ActRIIB sunt, de asemenea, deosebit de conservați. În consecință, din aceste alinieri, este posibil să se prezică pozițiile cheie ale aminoacizilor din domeniul de legare a ligandului, care sunt importante pentru activitățile normale de legare ActRIIB-ligand, precum și să se prezică pozițiile aminoacizilor care sunt susceptibile de a fi tolerante la substituție, fără a modifica semnificativ activități normale de legare a ActRIIB-ligand. Prin urmare, o variantă activă de polipeptidă ActRIIB umană utilă în conformitate cu prezentele metode dezvăluite poate include unul sau mai mulți aminoacizi în pozițiile corespunzătoare din secvența unui alt ActRIIB de vertebrat sau poate include un reziduu similar celui din secvențe umane sau alte vertebrate. Fără a dori să fie limitative, următoarele exemple ilustrează această abordare a definirii unei variante de ActRIIB active. L46 din domeniul extracelular uman (SEQ ID NO: 2) este o valină în ActRIIB de *Xenopus* (SEQ ID NO: 58), și astfel această poziție poate fi modificată și opțional poate fi modificată la un alt reziduu hidrofob, cum ar fi V, I sau F, sau un reziduu nepolar, cum ar fi A. E52 din domeniul extracelular uman este un K în *Xenopus*, indicând faptul că acest situs poate fi tolerant la o mare varietate de modificări, inclusiv reziduuri polare, cum ar fi E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y și probabil A. T93 din domeniul extracelular uman este un K în *Xenopus*, indicând faptul că o variație structurală largă este tolerată în această poziție, cu reziduurile polare favorizate, cum ar fi S, K, R, E, D, H, G, P, G și Y. F108 din domeniul extracelular uman este un Y în *Xenopus*, și, prin urmare, Y sau altă grupare hidrofobă, cum ar fi I, V sau L, ar trebui să fie tolerate. E111 din domeniul extracelular uman este K în *Xenopus*, indicând faptul că reziduurile cu sarcină vor fi tolerate în această poziție, inclusiv D, R, K și H, precum și Q și N. R112 din domeniul extracelular uman este K în *Xenopus*, indicând faptul că reziduurile bazice sunt tolerate în această poziție, inclusiv R și H. A din poziția 119 în domeniul extracelular uman este relativ slab conservat și apare ca P la rozătoare și V la *Xenopus*, astfel, în esență, orice aminoacid ar trebui să fie tolerat în această poziție.

Mai mult, proteinele ActRII au fost caracterizate în domeniu în ceea ce privește caracteristicile structurale și funcționale, în special în ceea ce privește legarea ligandului [Attisano și colab. (1992) *Cell* 68(1):97-108; Greenwald și colab. (1999) *Nature Structural Biology* 6(1): 18-22; Allendorph și colab. (2006) *PNAS* 103(20): 7643-7648; Thompson și colab. (2003) *The EMBO Journal* 22(7): 1555-1566; precum și Brevetele U.S. nr: 7,709,605, 7,612,041, și 7,842,663]. În plus față de învățăturile de aici, aceste referințe oferă îndrumări ample în ceea ce privește modul de generare a variantelor de ActRIIB care păstrează una sau mai multe activități normale (de exemplu, activitate de legare a liganzilor).

De exemplu, un motiv structural definitoriu, cunoscut sub numele de pliu de toxină cu trei degete, este important pentru legarea ligandului de către receptorii de tip I și tip II și este format din reziduuri de cisteină conservate situate în poziții diferite în cadrul domeniului extracelular al fiecărui receptor monomeric [Greenwald și colab. (1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22; și Hinck (2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]. În consecință, domeniile de legare ale ligandului de nucleu ale ActRIIB uman, așa cum sunt delimitate de cele mai din exterior dintre aceste cisteine conservate, corespund pozițiilor 29-109 din SEQ ID NO: 1 (precursor de ActRIIB). Aminoacizii mai puțin ordonați structural care înconjoară aceste secvențe de nucleu delimitate de cisteină pot fi trunchiate de 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 sau 28 reziduuri la capătul N-terminal și/sau 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 sau 22 reziduuri la capătul C-terminal fără a modifica în mod necesar legarea ligandului. Domeniile extracelulare ActRIIB exemplare pentru trunchierea N-terminală și/sau C-terminală includ SEQ ID NO: 2, 3, 5 și 6.

Attisano și colab. a arătat că o deleție a nodului prolinei la capătul C-terminal al domeniului extracelular al ActRIIB a redus afinitatea receptorului pentru activină. O proteină de fuziune ActRIIB-Fc conținând aminoacizi 20-119 din prezenta SEQ ID NO: 1, "ActRIIB (20-119) -Fc", a redus legarea la GDF11 și activină în raport cu un ActRIIB (20-134)-Fc, care include regiunea nodului prolinei și domeniul juxtamembranar complet (vezi, *de exemplu*, Brevetul U.S. Nr. 7,842,663). Cu toate acestea, o proteină ActRIIB (20-129)-Fc păstrează o activitate similară, dar oarecum redusă, în raport cu tipul sălbatic, chiar dacă regiunea nodului prolinei este întreruptă.

Astfel, domeniile extracelulare ActRIIB care se opresc la aminoacizii 134, 133, 132, 131, 130 și 129 (față de SEQ ID NO: 1) sunt toate de așteptat să fie active, dar construcții care se opresc la 134 sau 133 pot fi cei mai activi. Similar, mutațiile la oricare dintre reziduurile 129-134 (față de SEQ ID NO: 1) nu sunt de așteptat să modifice afinitatea de legare a ligandului cu margini mari. În susținerea acestui fapt, se cunoaște în domeniu că mutațiile P129 și P130 (față de SEQ ID NO: 1) nu scad substanțial legarea ligandului. Prin urmare, o polipeptidă ActRIIB conform prezentei dezvoltării se poate termina încă de la aminoacidul 109 (cisteina finală), totuși, formele care se termină cu sau între 109 și 119 (*de exemplu*, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, sau 119) se așteaptă să aibă o legare redusă a ligandului. Aminoacidul 119 (în raport cu prezenta SEQ ID NO: 1) este slab conservat și astfel este ușor de modificat sau trunchiat. Polipeptidele ActRIIB care se termină la 128 (față de SEQ ID NO: 1) sau mai târziu ar trebui să păstreze activitatea de legare a ligandului. Polipeptidele ActRIIB care se termină la sau între 119 și 127 (*de exemplu*, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, sau 127), față de SEQ ID NO: 1, vor avea o capacitate de legare intermediară. Oricare dintre aceste forme poate fi de dorit să se utilizeze, în funcție de unitatea clinică sau experimentală.

La capătul N-terminal al ActRIIB, este de așteptat ca o proteină care începe la aminoacidul 29 sau înainte (față de SEQ ID NO: 1) să păstreze activitatea de legare a ligandului. Aminoacidul 29 reprezintă cisteina inițială. O mutație alanină-asparagină în poziția 24 (față de SEQ ID NO: 1) introduce o secvență de glicozilare N-legată fără a afecta substanțial legarea ligandului [Brevet U.S. Nr. 7,842,663]. Aceasta confirmă faptul că mutațiile din regiunea dintre peptida de clivaj a semnalului și regiunea reticulată de cisteină, corespunzătoare aminoacizilor 20-29, sunt bine tolerate. În special, polipeptidele ActRIIB începând de la pozițiile 20, 21, 22, 23 și 24 (față de SEQ ID NO: 1) ar trebui să păstreze activitatea generală de legare a ligandului, iar polipeptidele ActRIIB începând de la pozițiile 25, 26, 27, 28, și 29 (față de SEQ ID NO: 1) este de așteptat, de asemenea, să păstreze activitatea de legare a ligandului S-a demonstrat, *de exemplu*, U.S. Patent No. 7,842,663, că, surprinzător, un construct de ActRIIB începând cu 22, 23, 24 sau 25 va avea cea mai mare activitate.

Luată împreună, o formulă generală pentru o porțiune activă (*de exemplu*, porțiunea de legare a ligandului) din ActRIIB cuprinde aminoacizii 29-109 din SEQ ID NO: 1. Prin urmare, polipeptidele ActRIIB pot, de exemplu, să cuprindă, consta în esență sau consta din o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune din ActRIIB începând cu un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 20-29 (*de exemplu*, începând cu oricare dintre aminoacizii 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29) din SEQ ID NO: 1 și care se termină într-o poziție corespunzătoare oricăruia dintre aminoacizii 109-134 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 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 sau 134) din SEQ ID NO: 1. Alte exemple includ polipeptide care încep într-o poziție de la 20 la 29 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29) sau 21-29 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29) din SEQ ID NO: 1 și se termină într-o poziție cuprinsă între 119-134 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 sau 134), 119-133 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 sau 133), 129-134 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 129, 130, 131, 132, 133 sau 134) sau 129-133 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 129, 130, 131, 132 sau 133) din SEQ ID NO: 1. Alte exemple includ construcții care încep de la o poziție de la 20 la 24 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 20, 21, 22, 23 sau 24), 21-24 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 21, 22, 23 sau 24) sau 22-25 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 22, 22, 23 sau 25) din SEQ ID NO: 1 și se termină într-o poziție de la 109-134 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 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 sau 134), 119-134 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 sau 134) sau 129-134 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 129, 130, 131, 132, 133 sau 134) din SEQ ID NO: 1. Sunt avute în vedere și variante din cadrul acestor intervale, în special cele care cuprind, constau în principal din sau constau dintr-o secvență de aminoacizi care are la cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% sau 100% identitate cu porțiunea corespunzătoare din SEQ ID NO: 1.

Variațiile descrise aici pot fi combinate în diferite moduri. În unele cazuri, variantele de ActRIIB cuprind nu mai mult de 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau 15 modificări conservative de aminoacizi în buzunarul de legare a ligandului, opțional zero, una sau mai multe modificări neconservative la poziții 40, 53, 55, 74, 79 și/sau 82 în buzunarul

de legare a ligandului. Siturile din afara buzunarului de legare, la care variabilitatea poate fi deosebit de bine tolerată, includ amino și carboxi terminale ale domeniului extracelular (așa cum s-a menționat mai sus) și pozițiile 42-46 și 65-73 (față de SEQ ID NO: 1). O modificare asparagină-la-alanină la poziția 65 (N65A) nu pare să scadă legarea ligandului în fundalul R64 [Brevet U.S. nr. 7,842,663]. Această modificare elimină probabil glicozilarea la N65 în fundalul A64, demonstrând astfel că este probabil să fie tolerată o schimbare semnificativă în această regiune. Deși o schimbare R64A este slab tolerată, R64K este bine tolerată și, prin urmare, un alt reziduu de bază, cum ar fi H, poate fi tolerat în poziția 64 [Brevet U.S. nr. 7,842,663]. În plus, rezultatele programului de mutagenză descris în domeniu indică faptul că există poziții de aminoacizi în ActRIIB care sunt adesea benefice pentru conservare. Față de SEQ ID NO: 1, aceasta include poziția 80 (aminoacid acid sau hidrofob), poziția 78 (hidrofob și, în special, triptofan), poziția 37 (acid, în special acid aspartic sau glutamic), poziția 56 (aminoacid bazic), poziția 60 (aminoacid hidrofob, în special fenilalanină sau tirozină). Astfel, dezvăluirea oferă un cadru de aminoacizi care pot fi conservați în polipeptidele ActRIIB. Alte poziții care pot fi de dorit să fie conservate sunt următoarele: poziția 52 (aminoacid acid), poziția 55 (aminoacid bazic), poziția 81 (acid), 98 (polar sau cu sarcină, în special E, D, R sau K), totul față de SEQ ID NO: 1.

S-a demonstrat anterior că adăugarea unui alt situs de glicozilare legat de N (N-X-S/T) în domeniul extracelular ActRIIB este bine tolerată (vezi, *de exemplu*, Brevetul U.S. nr. 7,842,663). Prin urmare, secvențele N-X-S/T pot fi introduse în general în poziții în afara buzunarului de legare a ligandului definit în Figura 1 în polipeptida ActRIIB din prezenta dezvăluire. Siturile deosebit de adecvate pentru introducerea secvențelor N-X-S/T neendogene includ aminoacizii 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 sau 129-134 (față de SEQ ID NO: 1). Secvențele N-X-S/T pot fi, de asemenea, introduse în linkerul dintre secvența de ActRIIB și un domeniu Fc sau altă componentă de fuziune, precum și opțional în componenta de fuziune însăși. Un astfel de situs poate fi introdus cu un efort minim prin introducerea unui N în poziția corectă în raport cu un S sau T preexistente sau prin introducerea unui S sau T într-o poziție corespunzătoare unui N preexistent. Astfel, modificările dorite care ar crea un situs de glicozilare legat de N sunt: A24N, R64N, S67N (posibil combinat cu o modificare N65A), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S și R112T (față de SEQ ID NO: 1). Orice S care este prezis a fi glicozilat poate fi modificat la un T fără a crea un situs imunogen, datorită protecției oferite de glicozilare. Similar, orice T care se prezice a fi glicozilat poate fi modificat la un S. Astfel, sunt avute în vedere modificările S67T și S44T (față de SEQ ID NO: 1). La fel, într-o variantă A24N, poate fi utilizată o modificare S26T. În consecință, o polipeptidă ActRIIB conform prezentei dezvăluiri poate fi o variantă având una sau mai multe secvențe consensuale de glicozilare N-legate neendogene, așa cum este descris mai sus.

În anumite cazuri, dezvăluirea se referă la antagoniști (inhibitori) GDF/BMP care cuprind o polipeptidă ActRIIB, care include fragmente, variante funcționale și forme modificate ale acestora, precum și utilizări ale acestora (de exemplu, tratarea sau prevenirea PH sau a uneia sau mai multor complicații asociate cu PH). De preferință, polipeptidele ActRIIB sunt solubile (de exemplu, cuprind un domeniu extracelular al ActRIIB). În unele cazuri, polipeptidele ActRIIB antagonizează activitatea (*de exemplu*, semnalizarea Smad) a unuia sau mai multor liganzi GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP15 și BMP10]. Prin urmare, în unele cazuri, polipeptidele ActRIIB se leagă la unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP15 și BMP10]. În

unele cazuri, polipeptidele ActRIIB din dezvoltare cuprind, constau în esență sau constau dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune din ActRIIB începând cu un reziduu corespunzător aminoacizilor 20-29 (de exemplu, începând cu oricare dintre aminoacizii 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29) din SEQ ID NO: 1 și se termină într-o poziție corespunzătoare aminoacizilor 109-134 (de exemplu, care se termină cu oricare dintre aminoacizii 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 sau 134) din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIB cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 29-109 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIB din dezvoltare cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 29-109 din SEQ ID NO: 1, în care poziția corespunzătoare L79 din SEQ ID NO: 1 este un aminoacid acid (aminoacizi acizi D și E naturali sau un aminoacid acid artificial). În anumite cazuri, polipeptidele ActRIIB din dezvoltare cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 25-131 din SEQ ID NO: 1. În anumite cazuri, polipeptidele ActRIIB din dezvoltare cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 25-131 din SEQ ID NO: 1, în care poziția corespunzătoare L79 din SEQ ID NO: 1 este un aminoacid acid. În unele cazuri, polipeptida ActRIIB din dezvoltare cuprinde, constă sau constă în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi a oricăruia dintre SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 40, 42, 45, 46, 47, 48, 69, 74, 77, 78, 79, 108, 110, 114, 115, 118 și 120. În unele cazuri, polipeptida ActRIIB din dezvoltare cuprinde, constă sau constă în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi a oricăreia dintre SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 40, 42, 45, 46, 47, 48, 69, 74, 77, 78, 79, 108, 110, 114, 115, 118 și 120, în care poziția corespunzătoare L79 din SEQ ID NO: 1 este un aminoacid acid. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIB din dezvoltare cuprind, constau sau constau în esență din cel puțin o polipeptidă ActRIIB în care poziția corespunzătoare L79 din SEQ ID NO: 1 nu este un aminoacid acid (*adică* nu este unul dintre aminoacizii acizi D sau E naturali sau un reziduu de aminoacid acid artificial).

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare se referă la polipeptide ActRIIA. Așa cum se utilizează aici, termenul "ActRIIA" se referă la o familie de proteine receptoare de activină tip IIA (ActRIIA) din orice specie și variante derivate din astfel de proteine ActRIIA prin mutageneză sau altă modificare. Referirea la ActRIIA de aici este înțeleasă a fi o referire la oricare dintre formele identificate în prezent. Membrii familiei ActRIIA sunt, în general, proteine transmembranare, compuse dintr-un domeniu extracelular care leagă ligandul cuprinzând o regiune bogată în cisteină, un domeniu transmembranar și un domeniu citoplasmatic cu activitate prezisă de serin/treonin kinază.

Termenul "polipeptidă ActRIIA" include polipeptide care cuprind orice polipeptidă naturală a unui membru al familiei ActRIIA precum și orice variante ale acestuia (inclusiv mutanți, fragmente, fuziuni și forme peptidomimetice) care păstrează o activitate utilă. Exemple de astfel de variante de polipeptide ActRIIA sunt redată pe parcursul prezentei dezvăluiri, precum și în Publicația cererii internaționale de brevet nr. WO 2006/012627 și WO 2007/062188. Numerotarea aminoacizilor pentru toate polipeptidele înrudite cu ActRIIA descrise aici se bazează pe numerotarea secvenței de proteine precursorare ActRIIA umană redată mai jos (SEQ ID NO: 9), cu excepția cazului în care este specificat altfel.

Secvența de proteine precursorare de ActRIIA umană canonică este după cum urmează:

```

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

```

Peptida semnal este indicată prin sublinierea cu o linie simplă; domeniul extracelular este indicat cu litere **aldine**; și potențialele situsuri de glicozilare N-legată endogene sunt indicate prin sublinierea dublă.

Secvența polipeptidică ActRIIA extracelulară umană procesată (matură) este după cum urmează:

```

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDD
INCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGPMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID
NO: 10)

```

"Coda" C-terminală a domeniului extracelular este indicată prin sublinierea cu o linie simplă. Secvența cu "coda" deletată (o secvență Δ15) este după cum urmează:

```

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDD
INCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGPMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 11)

```

Secvența de acid nucleic care codifică proteina precursoră de ActRIIA umană este prezentată mai jos (SEQ ID NO: 12), după cum urmează nucleotidele 159-1700 din secvența de referință Genbank NM_001616.4. Secvența semnalului este subliniată.

1 ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GGCGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTT
 51 TTCAGGTGCT AACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA
 101 ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AACTGGTGT TGAACCGTGT
 151 TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
 201 TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
 251 ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
 301 TATTTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT
 351 TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC
 401 CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT
 451 GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC
 501 CTACCCTCCT GTACTTGTTT CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCACCTT
 551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG
 601 GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC
 651 TGTCAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG
 701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT
 751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC
 801 AGCATTTTAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG
 851 TCTCTTGGA TGAAGTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG
 901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC
 951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAACAACC
 1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT TGAGGCTGGC
 1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC
 1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTTGA
 1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT GGCTTCTCGC
 1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA
 1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTGTGTC
 1301 ATAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA
 1351 ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA
 1401 AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA
 1451 GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTACCAATG
 1501 GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO:
 12)

Secvența de acid nucleic care codifică polipeptida ActRIIA umană solubilă (extracelulară) procesată este după cum urmează:

```

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

```

ActRIIA este bine conservat printre vertebrate, cu întinderi mari ale domeniului extracelular complet conservate. De exemplu, Figura 3 ilustrează o aliniere de mai multe secvențe ale unui domeniu extracelular ActRIIA uman comparativ cu diferiți ortologi de ActRIIA. Mulți dintre liganzii care se leagă la ActRIIA sunt, de asemenea, deosebit de conservați. În consecință, din aceste alinieri, este posibil să se prezică pozițiile cheie ale aminoacizilor din domeniul de legare a ligandului care sunt importante pentru activitățile normale de legare ale ActRIIA-ligand, precum și să se prezică pozițiile aminoacizilor care sunt susceptibile de a fi tolerante la substituție fără a modifica semnificativ activități normale de legare ActRIIA-ligand. Prin urmare, o variantă activă de polipeptidă ActRIIA umană utilă în conformitate cu prezentele metode dezvăluite poate include unul sau mai mulți aminoacizi în pozițiile corespunzătoare din secvența unui alt ActRIIA de vertebrat sau poate include un reziduu similar celei de la om sau alte secvențe de vertebrate.

Fără a însemna că sunt limitative, următoarele exemple ilustrează această abordare a definirii unei variante de ActRIIA active. Așa cum este ilustrat în Figura 3, F13 în domeniul extracelular uman este Y în ActRIIA de *Ovis aries* (SEQ ID NO. 62), *Gallus gallus* (SEQ ID NO: 65), *Bos Taurus* (SEQ ID NO: 66), *Tyto alba* (SEQ ID NO: 67) și *Myotis davidii* (SEQ ID NO: 68), indicând faptul că reziduurile aromatice sunt tolerate în această poziție, inclusiv F, W și Y. Q24 în domeniul extracelular uman este R în ActRIIA de *Bos Taurus*, indicând că reziduurile cu sarcină vor fi tolerate în această poziție, inclusiv D, R, K, H și E. S95 în domeniul extracelular uman este F în ActRIIA de *Gallus gallus* și *Tyto alba*, indicând faptul că acest situs poate fi tolerant la o mare varietate de modificări, inclusiv reziduuri polare, cum ar fi E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y și probabil reziduuri hidrofobe precum L, I sau F. E52 în domeniul extracelular uman este D în ActRIIA de *Ovis aries*, indicând faptul că reziduurile acide sunt tolerate în această poziție, inclusiv D și E. P29 în domeniul extracelular uman este relativ slab conservat, apărând ca S în ActRIIA de *Ovis aries* și L în ActRIIA de *Myotis davidii*, deci, în esență, orice aminoacid ar trebui tolerat în această poziție.

Mai mult, așa cum s-a discutat mai sus, proteinele ActRII au fost caracterizate în domeniu în ceea ce privește caracteristicile structurale/funcționale, în special în ceea ce privește legarea ligandului [Attisano și colab. (1992) Cell 68(1):97-108; Greenwald și colab. (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allendorph și colab. (2006) PNAS 103(20: 7643-7648; Thompson și colab. (2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566; precum și Brevete U.S. nr.: 7,709,605, 7,612,041, și 7,842,663]. În plus față de învățăturile de aici, aceste referințe oferă o ghidare amplă în ceea ce privește modul de generare a variantelor de ActRII care păstrează una sau mai multe activități dorite (de exemplu, activitatea de legare a liganzilor).

De exemplu, un motiv structural definitoriu, cunoscut sub numele de pliu de toxine cu trei degete, este important pentru legarea ligandului de către receptorii de tip I și tip II și este format din reziduuri de cisteină conservate localizate în poziții diferite

În cadrul domeniului extracelular al fiecărui receptor monomeric [Greenwald și colab. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; și Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. În consecință, domeniile de nucleu de legare ale ligandului ale ActRIIA umană, așa cum sunt delimitate de cele mai exterioare dintre aceste cisteine conservate, corespund pozițiilor 30-110 din SEQ ID NO: 9 (precursor ActRIIA). Prin urmare, aminoacizii mai puțin ordonați din punct de vedere structural care înconjoară aceste secvențe de nucleu delimitate de cisteină pot fi trunchiate cu aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 sau 29 de reziduuri la capătul N-terminal și cu aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 sau 25 reziduuri la capătul C-terminal fără a modifica în mod necesar legarea ligandului. Trunchierile exemplare ale domeniilor extracelulare de ActRIIA includ SEQ ID NO: 10 și 11.

În consecință, o formulă generală pentru o porțiune activă (de exemplu, legarea ligandului) a ActRIIA este o polipeptidă care cuprinde, constă în esență sau constă din aminoacizii 30-110 din SEQ ID NO: 9. Prin urmare, polipeptidele ActRIIA pot, de exemplu, cuprinde, consta în esență sau consta dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune din ActRIIA începând cu un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 21-30 (*de exemplu*, care încep cu oricare dintre aminoacizii 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30) din SEQ ID NO: 9 și se termină într-o poziție corespunzătoare oricărui aminoacid 110-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135) din SEQ ID NO: 9. Alte exemple includ construcții care încep dintr-o poziție selectată între 21-30 (*de exemplu*, începând de la oricare dintre aminoacizii 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30), 22-30 (*de exemplu*, începând de la oricare dintre aminoacizii 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30), 23-30 (*de exemplu*, începând de la oricare dintre aminoacizii 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30), 24-30 (*de exemplu*, începând cu oricare dintre aminoacizii 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30) din SEQ ID NO: 9, și se termină într-o poziție selectată dintre 111-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135), 112-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135), 113-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135), 120-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135), 130-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 130, 131, 132, 133, 134 sau 135), 111-134 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 sau 134), 111-133 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 sau 133), 111-132 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 sau 132) sau 111-131 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130 sau 131) din SEQ ID NO: 9. Sunt avute în vedere și variante din aceste intervale, în special cele care cuprind, constau în principal din sau constau dintr-o

secvență de aminoacizi care are cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu partea corespunzătoare din SEQ ID NO: 9. Astfel, în unele cazuri, o polipeptidă ActRIIA poate cuprinde, consta în esență sau consta dintr-o polipeptidă care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 30-110 din SEQ ID NO: 9 Opțional, polipeptidele ActRIIA cuprind o polipeptidă care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 30-110 din SEQ ID NO: 9 și care nu conține mai mult de 1, 2, 5, 10 sau 15 modificări conservative de aminoacizi în buzunarul de legare a ligandului.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la antagoniști (inhibitori) de GDF/BMP care cuprind o polipeptidă ActRIIA, care include fragmente, variante funcționale și forme modificate ale acestora, precum și utilizări ale acestora (de exemplu, creșterea unui răspuns imun la un pacient care are nevoie de acesta și tratarea cancerului). De preferință, polipeptidele ActRIIA sunt solubile (*de exemplu*, un domeniu extracelular al ActRIIA). În unele cazuri, polipeptidele ActRIIA inhibă (*de exemplu*, semnalizare Smad) a unuia sau mai multor liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP15 și/sau BMP10]. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIA se leagă la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP15 și/sau BMP10]. În unele cazuri, polipeptida ActRIIA din dezvoltare cuprinde, constă în principal sau constă dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune din ActRIIA începând cu un reziduu corespunzător aminoacizilor 21-30 (*de exemplu*, începând cu oricare dintre aminoacizii 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30) din SEQ ID NO: 9 și se termină într-o poziție corespunzătoare oricărui aminoacid 110-135 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 sau 135) din SEQ ID NO: 9. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIA cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 30-110 din SEQ ID NO: 9. În anumite cazuri, polipeptidele ActRIIA cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 21-135 din SEQ ID NO: 9. În unele cazuri, polipeptidele ActRIIA cuprind, constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi a oricăreia din SEQ ID NO: 9, 10, 11, 32, 36 și 39.

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare se referă la polipeptide capcană GDF (denumite și "capcane de GDF"). În unele cazuri, capcanele de GDF conform prezentei dezvoltării sunt variante de polipeptide ActRII (*de exemplu*, polipeptide ActRIIA și ActRIIB) care cuprind una sau mai multe mutații (*de exemplu*, aditii, deleții, substituții de aminoacizi și combinații ale acestora) în domeniul extracelular (denumit și domeniul de legare a ligandului) al unei polipeptide ActRII (*de exemplu*, o polipeptidă ActRII "de tip sălbatic" sau nemodificată) astfel încât varianta de polipeptidă de ActRII are una sau mai multe activități de legare a ligandului modificate față de polipeptida ActRII de

tip sălbatic corespunzătoare. În cazuri preferate, polipeptidele capcană de GDF conform prezentei dezvoltării păstrează cel puțin o activitate similară cu o polipeptidă ActRII de tip sălbatic corespunzătoare. De exemplu, capcanele de GDF preferabile se leagă și inhibă (*de exemplu*, antagonizează) funcția GDF11 și/sau GDF8. În unele cazuri, capcanele de GDF conform prezentei dezvoltării se leagă și inhibă în continuare unul sau mai mulți dintre liganzii GDF/BMP. În consecință, prezenta dezvoltării redă polipeptide capcană GDF care au o specificitate de legare modificată pentru unul sau mai mulți liganzi ai ActRII.

Pentru ilustrare, pot fi selectate una sau mai multe mutații care cresc selectivitatea domeniului modificat de legare a ligandului pentru GDF11 și/sau GDF8 peste unul sau mai mulți liganzi care leagă ActRII, cum ar fi activinele (activina A, activina B, activina AB modificat, activina C, și/sau activina E), în special activina A. Opțional, domeniul de legare a ligandului are un raport al K_d pentru legarea activinei la K_d pentru legarea GDF11 și/sau GDF8 care este cel puțin de 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100- sau chiar 1000-de ori mai mare față de raportul pentru domeniul de tip sălbatic de legare a ligandului. Opțional, domeniul modificat de legare a ligandului are un raport al IC_{50} pentru inhibarea activinei la IC_{50} pentru inhibarea GDF11 și/sau GDF8 care este cel puțin de 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100- sau chiar 1000-de ori mai mare decât domeniul de legare a ligandului de tip sălbatic. Opțional, domeniul modificat de legare a ligandului inhibă GDF11 și/sau GDF8 cu un IC_{50} de cel puțin de 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100- sau chiar 1000-de ori mai mic decât IC_{50} pentru inhibarea activinei.

Reziduuri de aminoacizi ale proteinelor ActRIIB (*de exemplu*, E39, K55, Y60, K74, W78, L79, D80 și F101 față de SEQ ID NO: 1) se află în buzunarul de legare a ligandului ActRIIB și ajută la legarea mediată la liganzii săi, inclusiv, de exemplu, activina A, GDF11 și GDF8. Astfel, prezenta dezvoltării redă polipeptide capcană GDF care cuprind un domeniu modificat de legare a ligandului (*de exemplu*, un domeniu de legare GDF8/GDF11) al unui receptor ActRIIB care cuprinde una sau mai multe mutații la acele resturi de aminoacizi.

Ca un exemplu specific, reziduul de aminoacizi încărcat pozitiv Asp (D80) al domeniului de legare a ligandului din ActRIIB poate fi mutat la un alt reziduu de aminoacizi pentru a produce o polipeptidă capcană GDF care se leagă preferențial la GDF8, dar nu la activină. De preferință, reziduul D80 față de SEQ ID NO: 1 se schimbă într-un reziduu de aminoacid selectat din grupul format din: un reziduu de aminoacid fără sarcină, un reziduu de aminoacid negativ și un reziduu de aminoacid hidrofob. Ca un alt exemplu specific, reziduul hidrofob L79 din SEQ ID NO: 1 poate fi modificat pentru a conferi proprietăți modificate de legare la activină-GDF11/GDF8. De exemplu, o substituție L79P reduce legarea GDF11 într-o măsură mai mare decât legarea activinei. În schimb, înlocuirea L79 cu un aminoacid acid [un acid aspartic sau acid glutamic; o substituție L79D sau o L79E] reduce foarte mult afinitatea de legare a activinei A, păstrând în același timp afinitatea de legare a GDF11. În cazuri exemplare, metodele descrise aici utilizează o polipeptidă capcană de GDF care este o variantă de polipeptidă ActRIIB cuprinzând un aminoacid acid (*de exemplu*, D sau E) în poziția corespunzătoare poziției 79 din SEQ ID NO: 1, opțional în combinație cu una sau mai multe substituții, aditii sau deleții suplimentare de aminoacizi.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la polipeptide ALK4 și utilizările acestora. Așa cum se utilizează aici, termenul "ALK4" se referă la o familie de proteine kinază-4 asemănătoare receptorului de activină din orice specie și variante derivate din astfel de proteine ALK4 prin mutagenază sau altă modificare. Referirea la ALK4 aici este înțeleasă ca fiind o referire la oricare dintre formele identificate în prezent. Membrii familiei ALK4 sunt în general proteine transmembranare, compuse dintr-un

domeniu extracelular care leagă ligandul cu o regiune bogată în cisteină, un domeniu transmembrantar și un domeniu citoplasmatic cu activitate precisă serin/treonin kinază.

Termenul "polipeptidă ALK4" include polipeptide care cuprind orice polipeptidă naturală a unui membru al familiei ALK4 precum și orice variante ale acestuia (inclusiv mutanți, fragmente, fuziuni și forme peptidomimetice) care păstrează o activitate utilă. Numerotarea aminoacizilor pentru toate polipeptidele înrudite cu ALK4 descrise aici se bazează pe numerotarea secvenței de proteine precursore a ALK4 umană de mai jos (SEQ ID NO: 100), cu excepția cazului în care este specificat altfel.

O secvență de proteină precursore de ALK4 umană (NCBI Ref Seqv. NP_004293) este după cum urmează:

I MAESAGASSF FPLVLLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG

ACMVSIFNLD

61 GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSEEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS

GHLKEPEHPS

121 MWGPVELVGI IAGPVFLFL I IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ

181 DLVYDLSTSG SGGGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD
VAVKIFSSRE

241 ERSWFREA EI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL
FDYLNRYTVT

301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQ GKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA
IADLGLAVRH

361 DAVTDTIDIA PNQRVGTKRY MAPEVLDETI NMKHFDSFKC ADIYALGLVY
WEIARRCNSG

421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG
KMMRECWYAN

481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (SEQ ID NO: 100)

Peptida semnal este indicată prin sublinierea cu o linie simplă iar domeniul extracelular este indicat cu litere **aldine**.

O secvență de polipeptidă ALK4 extracelulară umană procesată este după cum urmează:

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPFYCL

SSEDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO: 101)

O secvență de acid nucleic care codifică proteina precursore de ALK4 este prezentată mai jos (SEQ ID NO: 102), corespunzătoare nucleotidelor 78-1592 din secvența de referință Genbank NM_004302.4. Secvența semnal este subliniată și domeniul extracelular este indicat cu litere **aldine**.

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCCTCCTGCTCGCCGGCAG
CGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGG
 CCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATG
 GAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTA
 CTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGA
 TCGACTTGAGGGTGCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCG
 GTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCCCTCCTGTTCCCTCATCATCATCATTGT
 TTTCCCTTGTCAATTAACATATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAG
 ATCCCTCATGTGAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTC
 TCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCAT
 CGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCCGCTGGAGGG
 GTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCA
 GAGATATAACCAGACGGTCATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAA
 TAAAGATAATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCC
 TGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCT
 GCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGGAAGCCTGGAAT
 TGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAG
 CAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCATGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCCGAAT
 CAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAA
 ACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTG
 CTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTG
 CCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAA
 CATCCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGTATGGGGAAGATGATGCGAGAGT
 GTTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCTCCCAG
 CTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 102)

O secvență de acid nucleic care codifică polipeptida extracelulară a ALK4 este după cum urmează:

TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCCAACTA
 CAGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACC
 ATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTG
 AGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTT
 GAGGGTGCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTGGAG
 (SEQ ID NO: 103)

O izoformă alternativă a secvenței de proteină precursoră de ALK4 umană, izoforma B (NCBI Ref Seq NP_064732.3), este după cum urmează:

1 MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSSEDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH
 61 LKEPEHPSMW GPVELVGIIA GPVFLFLFLII IIVFLVINYH QRVYHNRQRL DMEDPSC EMC
 121 LSKDKTLQDL VYDLSTSGSG SGLPLFVQRT VARTIVLQEI IGKGRFGEVW RGRWRGGDVA
 181 VKIFSSREER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS DYHEHGSLEFD
 241 YLNRYTVTIE GMIKLALSAA SGLAHLHMEI VGTQGKPGIA HRDLKSKNIL VKKNGMCAIA
 301 DLGLAVRHDA VTDITIDIAPN QRVGTKRYMA PEVLDETINM KHFDSEFKCAD IYALGLVYWE
 361 IARRCNSGGV HEEYQLPYD LVPSDPSIEE MRKVVDQKL RPNIPNWWQS YEALRVMGKM
 421 MRECWYANGA ARLTALRIKK TLSQLSVQED VKI (SEQ ID NO: 104)

Domeniul extracelular este indicat cu litere aldine.

O secvență de polipeptidă extracelulară a ALK4 procesată este după cum urmează:

1 MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSSEDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH

61 LKEPEHPSMW GPVE (SEQ ID NO: 105)

O secvență de acid nucleic care codifică proteina precursoră de ALK4 (izoforma B) este prezentată mai jos (SEQ ID NO: 106), corespunzătoare nucleotidelor 186-1547 din secvența de referință Genbank NM_020327.3. Nucleotidele care codifică domeniul extracelular sunt indicate cu litere **aldine**.

1 **ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG**
 51 **CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA**
 101 **GCTCGGAGGA CCTGCGCAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC**
 151 **AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC**
 201 **GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AGCTGGTAGG CATCATCGCC GGCCCGGTGT**
 251 TCCTCCTGTT CCTCATCATC ATCATTGTTT TCCTTGTCAT TAACTATCAT
 301 CAGCGTGTCT ATCACAACCG CCAGAGACTG GACATGGAAG ATCCCTCATG
 351 TGAGATGTGT CTCTCCAAAG ACAAGACGCT CCAGGATCTT GTCTACGATC
 401 TCTCCACCTC AGGGTCTGGC TCAGGGTTAC CCCTCTTTGT CCAGCGCACA
 451 GTGGCCCGAA CCATCGTTTT ACAAGAGATT ATTGGCAAGG GTCGGTTTGG
 501 GGAAGTATGG CGGGGCCGCT GGAGGGGTGG TGATGTGGCT GTGAAAATAT
 551 TCTCTTCTCG TGAAGAACGG TCTTGGTTCA GGAAGCAGA GATATAACCAG
 601 ACGGTCATGC TGCGCCATGA AAACATCCTT GGATTTATTG CTGCTGACAA
 651 TAAAGATAAT GGCACCTGGA CACAGCTGTG GCTTGTTTCT GACTATCATG
 701 AGCACGGGTC CCTGTTTATG TATCTGAACC GGTACACAGT GACAATTGAG
 751 GGGATGATTA AGCTGGCCTT GTCTGCTGCT AGTGGGCTGG CACACCTGCA
 801 CATGGAGATC GTGGGCACCC AAGGGAAGCC TGGAATTGCT CATCGAGACT
 851 TAAAGTCAAA GAACATTCTG GTGAAGAAAA ATGGCATGTG TGCCATAGCA
 901 GACCTGGGCC TGGCTGTCCG TCATGATGCA GTCACTGACA CCATTGACAT
 951 TGCCCCGAAT CAGAGGGTGG GGACCAAACG ATACATGGCC CCTGAAGTAC
 1001 TTGATGAAAC CATTAAATATG AAACACTTTG ACTCCTTTAA ATGTGCTGAT
 1051 ATTTATGCCC TCGGGCTTGT ATATTGGGAG ATTGCTCGAA GATGCAATTC
 1101 TGGAGGAGTC CATGAAGAAT ATCAGCTGCC ATATTACGAC TTAGTGCCCT
 1151 CTGACCCTTC CATTGAGGAA ATGCGAAAGG TTGTATGTGA TCAGAAGCTG
 1201 CGTCCCAACA TCCCAACTG GTGGCAGAGT TATGAGGCAC TGCGGGTGAT
 1251 GGGGAAGATG ATGCGAGAGT GTTGGTATGC CAACGGCGCA GCCCGCCTGA
 1301 CGGCCCTGCG CATCAAGAAG ACCCTCTCCC AGCTCAGCGT GCAGGAAGAC
 1351 GTGAAGATCT AA (SEQ ID NO: 106)

O secvență de acid nucleic care codifică polipeptida extracelulară ALK4 (izoforma B) este după cum urmează:

```

1  ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG
51  CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA
101 GCTCGGAGGA CCTGCGCAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC
151 AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC
201 GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AGCTGGTAGG (SEQ ID NO: 107)

```

ALK4 este bine conservat printre vertebrate, cu întinderi mari ale domeniului extracelular complet conservate. De exemplu, Figura 18 descrie o aliniere cu mai multe secvențe a unui domeniu extracelular de ALK4 uman comparativ cu diferiți ortologi de ALK4. Mulți dintre liganzii care se leagă la ALK4 sunt, de asemenea, deosebit de conservați. În consecință, din aceste alinieri, este posibil să se prezică pozițiile cheie ale aminoacizilor în domeniul de legare a ligandului care sunt importante pentru activitățile normale de legare a ligandului la ALK4, precum și să se prezică pozițiile aminoacizilor care sunt susceptibile de a fi tolerante la substituție fără a modifica semnificativ activitățile normale de legare a ligandului la ALK4. Prin urmare, o variantă activă a polipeptidei ALK4 umană utilă în conformitate cu metodele prezentate în prezent poate include unul sau mai mulți aminoacizi la pozițiile corespunzătoare din secvența unui alt vertebrat ALK4 sau poate include un reziduu similar cu cel din om sau altul secvențe de vertebrate.

Fără a se intenționa să fie limitative, următoarele exemple ilustrează această abordare pentru definirea unei variante active a ALK4. Așa cum este ilustrat în Figura 18, V6 din domeniul extracelular ALK4 uman (SEQ ID NO: 126) este izoleucină în ALK4 de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 130), și astfel poziția poate fi modificată și, opțional, poate fi modificată la un alt reziduu hidrofob, cum ar fi L, I sau F, sau un reziduu nepolar, cum ar fi A, așa cum se observă în ALK4 de *Gallus gallus* (SEQ ID NO: 129). E40 din domeniul extracelular uman este K în ALK4 de *Gallus gallus*, indicând faptul că acest situs poate fi tolerant pentru o mare varietate de modificări, inclusiv reziduuri polare, cum ar fi E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y și probabil un reziduu nepolar, cum ar fi ca A. S15 din domeniul extracelular uman este D în ALK4 de *Gallus gallus*, indicând faptul că în această poziție este tolerată o variație structurală largă, cu reziduuri polare favorizate, cum ar fi S, T, R, E, K, H, G, P, G și Y. E40 din domeniul extracelular uman este K în ALK4 de *Gallus gallus*, indicând faptul că reziduurile cu sarcină vor fi tolerate în această poziție, inclusiv D, R, K, H, precum și Q și N. R80 din domeniul extracelular uman este K în ALK4 de *Condylura cristata* (SEQ ID NO: 127), indicând faptul că reziduurile bazice sunt tolerate în această poziție, inclusiv R, K și H. Y77 din domeniul extracelular uman este F în ALK4 de *Sus scrofa* (SEQ ID NO: 131), indicând faptul că reziduurile aromatice sunt tolerate în această poziție, inclusiv F, W și Y. P93 din domeniul extracelular uman este relativ slab conservat, apărând ca S în ALK4 de *Erinaceus europaeus* (SEQ ID NO: 128) și N în ALK4 de *Gallus gallus*, deci, în esență, orice aminoacid ar trebui să fie tolerat în această poziție.

Mai mult, proteinele ALK4 au fost caracterizate în domeniu în ceea ce privește caracteristicile structurale și funcționale, în special în ceea ce privește legarea ligandului [de exemplu, Harrison și colab. (2003) *J Biol Chem* 278(23):21129-21135; Romano și colab. (2012) *J Mol Model* 18(8):3617-3625; și Calvanese și colab. (2009) 15(3):175-183]. În plus față de învățăturile de aici, aceste referințe oferă o ghidare amplă pentru modul de generare a variantelor de ALK4 care păstrează una sau mai multe activități normale (de exemplu, activitate de legare a ligandului).

De exemplu, un motiv structural definitoriu, cunoscut sub numele de pliu de toxină cu trei degete, este important pentru legarea ligandului de către receptorii de tip

I și tip II și este format din reziduuri de cisteină conservate situate la poziții diferite în cadrul domeniului extracelular al fiecărui receptor monomeric [Greenwald și colab. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; și Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. În consecință, domeniile de legare a ligandului la domeniile de nucleu ale ALK4 uman, așa cum sunt delimitate de cele mai exterioare dintre aceste cisteine conservate, corespund pozițiilor 34-101 din SEQ ID NO: 100 (precursor de ALK4). Aminoacizii mai puțin ordonați structural care înconjoară aceste secvențe de nucleu delimitate de cisteină pot fi trunchiate la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 reziduuri la capătul N-terminal și/sau de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 sau 25 reziduuri la capătul C-terminal fără a se modifica în mod necesar legarea ligandului. Exemple de domenii extracelulare de ALK4 pentru trunchierea N-terminal și/sau C-terminal includ SEQ ID NO: 101 și 105.

În consecință, o formulă generală pentru o porțiune activă (de exemplu, o porțiune de legare a ligandului) din ALK4 cuprinde aminoacizii 34-101 față de SEQ ID NO: 100. Prin urmare, polipeptidele ALK4 pot, de exemplu, cuprinde, consta în esență din sau consta dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune de ALK4 începând de la un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 24-34 (*de exemplu*, începând cu oricare dintre aminoacizii 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 sau 34) din SEQ ID NO: 100 și care se termină într-o poziție corespunzătoare oricăruia dintre aminoacizii 101-126 (*de exemplu*, care se termină la oricare dintre aminoacizii 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 sau 126) din SEQ ID NO: 100. Alte exemple includ construcții care încep dintr-o poziție de la 24 la 34 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 sau 34), 25-34 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 sau 34) sau 26-34 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 sau 34) din SEQ ID NO: 100 și se termină într-o poziție de la 101-126 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 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 sau 126), 102-126 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 sau 126), 101-125 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 sau 125), 101-124 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, sau 124), 101-121 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 sau 121), 111-126 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 sau 126), 111-125 (*de exemplu*, oricare din pozițiile 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 sau 125), 111-124 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123 sau 124), 121-126 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 121, 122, 123, 124, 125 sau 126), 121 -125 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 121, 122, 123, 124 sau 125), 121-124 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 121, 122, 123 sau 124) sau 124-126 (*de exemplu*, oricare dintre pozițiile 124, 125 sau 126) din SEQ ID NO: 100. Variantele cuprinse în aceste intervale sunt, de asemenea, avute în vedere, în special cele care au cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu porțiunea corespunzătoare din SEQ ID NO: 100.

Variațiile descrise aici pot fi combinate în diferite moduri. În unele cazuri, variantele ALK4 cuprind nu mai mult de 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau 15 modificări conservative de aminoacizi în buznarul de legare a ligandului. Siturile din afara buznarului de legare, la care variabilitatea poate fi deosebit de bine tolerată, includ capetele amino și carboxi terminale ale domeniului extracelular (așa cum a fost menționat mai sus).

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la antagoniști de BMP/GDF care sunt heteromultimeri cuprinzând cel puțin o polipeptidă ALK4, care include fragmente, variante funcționale și forme modificate ale acestora, precum și utilizări ale acestora (de exemplu, tratarea, prevenirea sau reducerea severității PAH sau a uneia sau mai multor complicații ale PAH). De preferință, polipeptidele ALK4 sunt solubile (*de exemplu*, un domeniu extracelular al ALK4). În unele cazuri, heteromultimerii care cuprind o polipeptidă ALK4 inhibă (de exemplu, semnalizarea Smad) a unuia sau mai multor liganzi ai superfamiliei de TGFβ [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP10 și/sau BMP9]. În unele cazuri, heteromultimerii care cuprind o polipeptidă ALK4 se leagă la unul sau mai mulți liganzi ai superfamiliei de TGFβ [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP10 și/sau BMP9]. În unele cazuri, heteromultimerii cuprind cel puțin o polipeptidă ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100% identică cu aminoacizii 34-101 față de SEQ ID NO: 100. În unele cazuri, heteromultimerii cuprind cel puțin o polipeptidă ALK4 care este cel puțin de 70 %, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 100, 101, 104, 105, 111, 113, 116, 117, 122 și 124. În unele cazuri, heteromultimerul cuprinde cel puțin o polipeptidă ALK4 care constă sau constă în esență, din cel puțin o polipeptidă ALK4 care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 100: 101, 104, 105, 111, 113, 116, 117, 122 și 124.

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare se referă la complecși heteromultimeri care cuprind una sau mai multe polipeptide ale receptorului de ALK4 (de exemplu, SEQ ID NO. 100, 101, 104, 105, 111, 113, 116, 117, 122 și 124 și variante ale acestora) și una sau mai multe polipeptide ale receptorului de ActRIIB (de exemplu, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 77, 78, 108, 110, 114, 115, 118 și 120 și variante de teren ale acestora), care sunt denumite în general aici "complecși heteromultimeri ALK4:ActRIIB" sau "heteromultimeri ALK4:ActRIIB", inclusiv utilizări ale acestora (de exemplu, creșterea unui răspuns imun la un pacient care are nevoie de acesta și tratarea cancerului). De preferință, heteromultimerii ALK4:ActRIIB sunt solubili [*de exemplu*, un complex heteromultimer cuprinde o porțiune solubilă (domeniu) a unui receptor de ALK4 și o porțiune solubilă (domeniu) a unui receptor ActRIIB]. În general, domeniile extracelulare ale ALK4 și ActRIIB corespund porțiunii solubile a acestor receptori. Prin urmare, în unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind un domeniu extracelular al unui receptor de ALK4 și un domeniu extracelular al unui receptor de ActRIIB. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB inhibă (de exemplu, semnalizarea Smad) a unuia sau mai multor liganzi ai superfamiliei TGFβ [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP10 și/sau BMP9]. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB se leagă la unul sau mai mulți liganzi ai

superfamiliei TGF β [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP10 și/sau BMP9]. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind cel puțin o polipeptidă ALK4 care cuprinde, constă în esență sau constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 100, 101, 104, 105, 111, 113, 116, 117, 122 și 124. În unele cazuri, complexii heteromultimeri ALK4:ActRIIB din dezvoltare cuprind cel puțin o polipeptidă ALK4 care cuprinde, constă în esență din, constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70 %, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune de ALK4 începând cu un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 24-34, 25-34 sau 26-34 din SEQ ID NO: 100 și se termină într-o poziție de la 101-126, 102-126, 101-125, 101-124, 101-121, 111-126, 111-125, 111-124, 121-126, 121-125, 121-124 sau 124-126 din SEQ ID NO: 100. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind cel puțin o polipeptidă ALK4 care cuprinde, constă în esență din, constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identic cu aminoacizii 34-101 față de SEQ ID NO: 100. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4-ActRIIB cuprind cel puțin o polipeptidă ActRIIB care cuprinde, constă în esență din, constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența de aminoacizi a oricăreia dintre SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 77, 78, 108, 110, 114, 115, 118 și 120. În unele cazuri, complexii heteromultimeri ALK4:ActRIIB din dezvoltare cuprind cel puțin de o polipeptidă ActRIIB care cuprinde, constă în esență din, constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu o porțiune din ActRIIB începând cu un reziduu corespunzător oricăruia dintre aminoacizii 20-29, 20-24, 21-24, 22-25 sau 21-29 și se termină într-o poziție de la 109-134, 119-134, 119-133, 129-134 sau 129-133 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind cel puțin o polipeptidă ActRIIB care cuprinde, constă în esență din, constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70 %, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 29-109 din SEQ ID NO: 1. În unele cazuri, heteromultimerii ALK4:ActRIIB cuprind cel puțin o polipeptidă ActRIIB care cuprinde, constă în esență din, constă dintr-o secvență care este cel puțin de 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu aminoacizii 25-131 din SEQ ID NO: 1. În anumite cazuri, complexii heteromultimeri ALK4:ActRIIB din dezvoltare cuprind cel puțin o polipeptidă ActRIIB în care poziția corespunzătoare lui L79 din SEQ ID NO: 1 nu este un aminoacid acid (*adică* nu sunt reziduuri de aminoacid D sau E naturali sau reziduuri de aminoacizi acizi artificiali). Heteromultimerii ALK4:ActRIIB ai dezvoltării includ, de exemplu, heterodimeri, heterotrimeri, heterotetrameri și alte structuri oligomerice de ordin superior. Vezi, de exemplu, figurile 21-23. În anumite cazuri preferate, complexii heteromultimeri ai dezvoltării sunt heterodimeri ALK4:ActRIIB.

În unele cazuri, prezenta dezvoltare are în vedere realizarea de variante funcționale prin modificarea structurii unei polipeptide ActRII și/sau ALK4 în scopuri precum îmbunătățirea eficacității terapeutice sau a stabilității (de exemplu, durata de valabilitate și rezistența la degradarea proteolitică *in vivo*). Variantele pot fi produse prin substituție de, deleție, adăugare de aminoacizi sau combinații ale acestora. De exemplu, este rezonabil să ne așteptăm ca o înlocuire izolată a unei leucine cu o

izoleucină sau valină, un aspartat cu un glutamat, o treonină cu o serină sau un înlocuitor similar al unui aminoacid cu un aminoacid înrudit structural (*de exemplu*, mutații conservative) nu vor avea un efect major asupra activității biologice a moleculei rezultate. Înlocuirile conservative sunt cele care au loc într-o familie de aminoacizi care sunt înrudiți în lanțurile lor laterale. Dacă o modificare în secvența de aminoacizi a unei polipeptide conform dezvoltării are ca rezultat un omolog funcțional, poate fi ușor de determinat prin evaluarea capacității polipeptidei variante de a produce un răspuns în celule, similar cu polipeptida de tip sălbatic sau se leagă la unul sau mai mulți liganzi TGF-beta, inclusiv, de exemplu, 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, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrofic derivat de celule gliale (GDNF), neurturină, artemină, persefină, MIS și Lefty.

În anumite cazuri, prezenta dezvoltării are în vedere mutații specifice ale unei polipeptide ActRII și/sau ALK4, astfel încât să se modifice glicozilarea polipeptidei. Astfel de mutații pot fi selectate astfel încât să introducă sau să elimine unul sau mai multe situsuri de glicozilare, cum ar fi situsuri de glicozilare legate de O sau legate de N. Situsurile de recunoaștere a glicozilării legate de asparagină cuprind în general o secvență tripeptidică, asparagină-X-treonină sau asparagină-X-serină (unde "X" este orice aminoacid) care este recunoscută specific de enzima de glicozilare celulară adecvate. Modificarea poate fi făcută, de asemenea, prin adăugarea sau substituția cu unul sau mai multe reziduuri de serină sau treonină la secvența polipeptidei (pentru situsurile de glicozilare legate de O). O varietate de substituții sau deleții de aminoacizi la una sau ambele din prima sau a treia poziție de aminoacid a unui situs de recunoaștere a glicozilării (și/sau deleție a aminoacizilor în a doua poziție) are ca rezultat neglicozilarea la secvența tripeptidă modificată. Un alt mijloc de creștere a numărului de fragmente de carbohidrați pe o polipeptidă este prin cuplarea chimică sau enzimatică a glicozidelor la polipeptidă. În funcție de modul de cuplare utilizat, zahărul(rile) poate(pot) fi atașat(e) la (a) arginină și histidină; (b) grupări carboxil libere; (c) grupări sulfhidril libere, cum ar fi cele ale cisteinei; (d) grupări hidroxil libere cum ar fi cele ale serinei, treoninei sau hidroxiprolinei; (e) reziduuri aromatice, cum ar fi cele ale fenilalaninei, tirozinei sau triptofanului; sau (f) gruparea amidică a glutaminei. Îndepărtarea uneia sau mai multor porțiuni de carbohidrați prezente pe o polipeptidă poate fi realizată chimic și/sau enzimatic. Deglicozilarea chimică poate implica, de exemplu, expunerea unei polipeptide la compusul acid trifluormetansulfonic sau la un compus echivalent. Acest tratament are ca rezultat scindarea majorității sau a tuturor zaharurilor, cu excepția zahărului de legare (N-acetilglucozamina sau N-acetilgalactozamina), lăsând în același timp secvența de aminoacizi intactă. Clivarea enzimatică a fragmentelor de carbohidrați pe polipeptide poate fi realizată prin utilizarea unei varietăți de endo- și exo-glicozidaze, așa cum este descris de Thotakura și *colab.* [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]. Secvența unei polipeptide poate fi ajustată, după caz, în funcție de tipul de sistem de exprimare utilizat, deoarece celulele de mamifere, drojdii, insecte și plante pot introduce modele diferite de glicozilare care pot fi afectate de secvența de aminoacizi a peptidei. În general, polipeptidele conform prezentei dezvoltării, pentru utilizare la om, pot fi exprimate într-o linie de celule de mamifere care asigură glicozilarea adecvată, cum ar fi liniile de celule HEK293 sau CHO, deși este de așteptat ca și alte linii de celule de exprimare de mamifere să fie de asemenea utile.

Prezenta dezvoltare mai are în vedere o metodă de generare a mutanților, în special seturi de mutanți combinatorii ai unei polipeptide ActRII și/sau ALK4, precum și mutanți de trunchiere. Comasatele de mutanți combinatorii sunt utile în special pentru identificarea secvențelor ActRII active funcțional (de exemplu, legarea ligandului GDF/BMP). Scopul screeningului acestor biblioteci combinatorii poate fi acela de a genera, de exemplu, variante de polipeptide care au proprietăți modificate, cum ar fi modificarea farmacocineticii sau modificarea legării ligandului. O varietate de teste de screening sunt redate mai jos și astfel de teste pot fi utilizate pentru a se evalua variante. De exemplu, variantele ActRII și/sau ALK4 și heteromultimerii care le conțin, pot fi selectate pentru capacitatea de a se lega la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP (de exemplu, 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, activina A, activina B, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrofic derivat din celule gliale (GDNF), neurturină, artemină, persefină, MIS și Lefty), pentru a preveni legarea unui ligand de GDF/BMP la o polipeptidă ActRII și/sau ALK4, precum și la heteromultimerii ai acestora și/sau pentru a interfera cu semnalizarea cauzată de un ligand de GDF/BMP.

Activitatea polipeptidelor ActRII, a polipeptidelor ALK4 și a heterodimerilor ALK4:ActRIIB pot fi, de asemenea, testate *in vivo* printr-o analiză pe bază de celule. De exemplu, a fost evaluat efectul unei polipeptide ActRII, polipeptida ALK4 sau heterodimer ALK4:ActRIIB asupra exprimării genelor implicate în patogeneza PH. Aceasta se poate efectua, după cum este necesar, în prezența uneia sau mai multor proteine ligand recombinante (de exemplu, 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, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, nodal, factor neurotrofic derivat din celule gliale (GDNF), neurturină, artemină, persefină, MIS și Lefty) și celulele pot fi transfectate astfel încât să producă o polipeptidă ActRII, o polipeptidă ALK4 sau un heterodimer ALK4:ActRIIB și opțional, un ligand de GDF/BMP. La fel, o polipeptidă ActRII, o polipeptidă ALK4 sau un heterodimer ALK4:ActRIIB poate fi administrat la un șoarece sau alt animal și efectele asupra patogenezei PH pot fi evaluate folosind metode recunoscute în domeniu. Similar, activitatea unei polipeptide ActRII, a unei polipeptide ALK4 sau a heterodimerului ALK4:ActRIIB sau a unei variante a acestora poate fi testată în celulele precursorale ale celulelor sanguine în ceea ce privește orice efect asupra creșterii acestor celule, de exemplu, prin analizele descrise aici și cele care sunt cunoscute uzual în domeniu. O genă raportoare care răspunde la SMAD poate fi utilizată în astfel de linii celulare pentru a monitoriza efectele asupra semnalizării din aval.

Pot fi generate variante derivate combinatorial care au o selectivitate crescută sau, în general, o creștere a puterii față de o polipeptidă ActRII de referință, o polipeptidă ALK4 sau heterodimer ALK4:ActRIIB. Astfel de variante, atunci când sunt exprimate din construcții de ADN recombinant, pot fi utilizate în protocoale de terapie genetică. Similar, mutagenеза poate da naștere unor variante care au perioade de înjumătățire intracelulară dramatic diferite de polipeptida ActRII, polipeptida ALK4 sau heterodimerul ALK4:ActRIIB nemodificate corespunzătoare. De exemplu, proteina modificată poate fi făcută să fie mai stabilă sau mai puțin stabilă la degradarea proteolitică sau la alte procese celulare care au ca rezultat distrugerea sau inactivarea altfel a unei polipeptide nemodificate. Astfel de variante și genele care le codifică pot fi utilizate pentru a modifica nivelurile complexului de polipeptide prin modularea

timpului de înjumătățire al polipeptidei. De exemplu, un timp de înjumătățire scurt poate da naștere la efecte biologice mai tranzitorii și, atunci când face parte dintr-un sistem de exprimare inductibil, poate permite un control mai strict al nivelurilor complexului de polipeptide recombinante din interiorul celulei. Într-o proteină de fuziune Fc, pot fi făcute mutații în linker (dacă există) și/sau în porțiunea Fc pentru a modifica timpul de înjumătățire al polipeptidei ActRII, polipeptidei ALK4 sau heterodimerului ALK4:ActRIIB.

O bibliotecă combinatorie poate fi produsă cu ajutorul unei biblioteci degenerate de gene care codifică o bibliotecă de polipeptide care include fiecare cel puțin de o porțiune din potențiala polipeptidă ActRII, polipeptidă ALK4 sau secvențe heterodimere ALK4:ActRIIB. De exemplu, un amestec de oligonucleotide sintetice poate fi ligat enzimatic în secvențe genetice astfel încât setul degenerat de potențiale secvențe de codificare ActRII și/sau ALK4 să fie exprimabile ca polipeptide individuale sau, alternativ, ca un set de proteine de fuziune mai mari (de exemplu, pentru afișarea fașilor).

Există multe modalități prin care poate fi generată biblioteca de potențiali omologi dintr-o secvență degenerată de oligonucleotide. Sinteza chimică a unei secvențe genetice degenerate poate fi efectuată într-un sintetizator automat de ADN, iar genele sintetice pot fi apoi ligate într-un vector adecvat pentru exprimare. Sinteza oligonucleotidelor degenerate este bine cunoscută în domeniu [Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura și colab. (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura și colab. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura și colab. (1984) *Science* 198:1056; și Ike și colab. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477]. Astfel de tehnici au fost utilizate în evoluția dirijată a altor proteine [Scott și colab., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts și colab. (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin și colab. (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla și colab., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; precum și Brevete U.S. nr.: 5,223,409, 5,198,346, și 5,096,815].

Alternativ, pot fi utilizate alte forme de mutageneză pentru a genera o bibliotecă combinatorie. De exemplu, polipeptidele ActRII, polipeptidele ALK4 și heterodimerii ALK4:ActRIIB conform dezvoltării pot fi generați și izolați dintr-o bibliotecă prin screening folosind, de exemplu, mutageniza de scanare a alaninei [Ruf și colab. (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang și colab. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint și colab. (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg și colab. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima și colab. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman și colab. (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; și Cunningham și colab. (1989) *Science* 244:1081-1085], prin mutagenză de scanare a linkerului [Gustin și colab. (1993) *Virology* 193:653-660; și Brown și colab. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight și colab. (1982) *Science* 232:316], prin mutagenză de saturație [Meyers și colab., (1986) *Science* 232:613]; prin mutagenză PCR [Leung și colab. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1: 11-19]; sau prin mutagenză aleatorie, inclusiv mutagenză chimică [Miller și colab. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; și Greener și colab. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34]. Mutagenza de scanare a linkerului, în special într-un cadru combinatoriu, este o metodă atractivă pentru identificarea formelor trunchiate (bioactive) de polipeptide ActRII, polipeptide ALK4 sau heterodimeri ALK4:ActRIIB.

O gamă largă de tehnici sunt cunoscute în domeniu pentru screening-ul produselor genetice ale bibliotecilor combinatorii realizate prin mutații punctuale și trunchieri și, de altfel, pentru screeningul bibliotecilor de ADNc pentru produse genetice care au o anumită proprietate. Astfel de tehnici vor fi în general adaptabile pentru

screeningul rapid al bibliotecilor genetice generate de mutageneza combinatorie a polipeptidelor ActRII. Cele mai utilizate tehnici pentru screening-ul bibliotecilor genetice mari cuprind de obicei clonarea bibliotecii genetice în vectori de exprimare replicabili, transformarea celulelor adecvate cu biblioteca rezultată de vectori și exprimarea genelor combinatorii în condiții în care detectarea unei activități dorite facilitează izolarea relativ ușoară a vectorului care codifică gena al cărui produs a fost detectat. Analizele preferate includ ligand (*de exemplu*, 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, activină A, activină B, activină C, activină E, activină AB, activină AC, nodală, factor neurotrofic derivat din celule gliale (GDNF), neurtină, artemin, persefină, MIS și Lefty) analize de legare și/sau analize de semnalizare celulară mediate de ligand.

După cum va fi recunoscut de către un specialist în domeniu, cele mai multe dintre mutațiile, variantele sau modificările descrise aici pot fi efectuate la nivelul acidului nucleic sau, în unele cazuri, prin modificare post-translațională sau sinteză chimică. Astfel de tehnici sunt bine cunoscute în domeniu și unele dintre ele descrise aici. În parte, prezenta dezvoltare identifică porțiuni (fragmente) active și variante ale polipeptidelor ActRII, polipeptidelor ALK4 sau heterodimerului ALK4:ActRIIB care pot fi folosite ca ghidare pentru generarea și utilizarea altor variante de polipeptide ActRII în cadrul dezvoltării redată aici.

În anumite cazuri, fragmente active funcțional de polipeptide ActRII, polipeptide ALK4 și heterodimeri ALK4:ActRIIB din prezenta dezvoltare pot fi obținute prin screeningul polipeptidelor produse recombinant din fragmentul corespunzător al acidului nucleic care codifică o polipeptidă ActRII și/sau ALK4. În plus, fragmentele pot fi sintetizate chimic utilizând tehnici cunoscute în domeniu, cum ar fi Merrifield convențională f-Moc în fază solidă sau chimia t-Boc. Fragmentele pot fi produse (recombinant sau prin sinteză chimică) și testate pentru a se identifica acele fragmente de peptidă care pot funcționa ca antagoniști (inhibitori) ai receptorilor de ActRII și/sau ALK4 și/sau unul sau mai mulți liganzi (*de exemplu*, 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, activină A, activină B, activină C, activină E, activină AB, activină AC, nodală, factor neurotrofic derivat din celule gliale (GDNF), neurtină, artemin, persefină, MIS și Lefty).

În anumite cazuri, polipeptida ActRII, polipeptida ALK4 și/sau heterodimerul ALK4:ActRIIB conform prezentei dezvoltării pot cuprinde în plus modificări post-translaționale, suplimentar față de oricare prezentă în mod natural în polipeptida ActRII, polipeptida ALK4 sau heterodimerul ALK4:ActRIIB. Astfel de modificări includ, dar nu se limitează la, acetilare, carboxilare, glicozilare, fosforilare, lipidare și acilare. Ca rezultat, polipeptida ActRII, polipeptida ALK4 sau heterodimerul ALK4:ActRIIB poate conține elemente non-aminoacidice, cum ar fi polietilenglicoli, lipide, polizaharide sau monozaharide și fosfați. Efectele acestor elemente non-aminoacide asupra funcționalității unei polipeptide capcană de ligand pot fi testate așa cum este descris aici pentru alte variante de ActRII, ALK4 și ALK4:ActRIIB. Când o polipeptidă conform dezvoltării este produsă în celule prin scindarea unei forme native a polipeptidei, prelucrarea post-translațională poate fi, de asemenea, importantă pentru pliarea corectă și/sau funcționarea proteinei. Diferite celule (*de exemplu*, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 sau HEK293) au mașinăria celulară specifică și mecanisme caracteristice pentru astfel de activități post-translaționale și pot fi alese pentru a asigura modificarea și prelucrarea corectă a polipeptidelor ActRII.

În anumite cazuri, polipeptidele ActRII și ALK4 din prezenta dezvoltare includ proteine de fuziune având cel puțin o porțiune (domeniu) dintr-o polipeptidă ActRII sau ALK4 și una sau mai multe porțiuni (domenii) heterologe. Exemple bine-cunoscute de astfel de domenii de fuziune includ, dar nu se limitează la, polihistidină, Glu-Glu, glutatión S-transferază (GST), tioredoxină, proteină A, proteină G, o regiune constantă a lanțului greu al imunoglobulinei (Fc), proteina de legare a maltozei (MBP) sau albumina serică umană. Un domeniu de fuziune poate fi selectat astfel încât să confere o proprietate dorită. De exemplu, unele domenii de fuziune sunt deosebit de utile pentru izolarea proteinelor de fuziune prin cromatografie de afinitate. În scopul purificării de afinitate, se folosesc matrice relevante pentru cromatografia de afinitate, cum ar fi rășini conjugate cu glutatión, amilază și nichel sau cobalt. Multe dintre aceste matrice sunt disponibile sub formă de "kit", cum ar fi sistemul de purificare Pharmacia GST și sistemul QIAexpress™ (Qiagen) util cu parteneri de fuziune (HIS₆). Ca un alt exemplu, un domeniu de fuziune poate fi selectat astfel încât să faciliteze detectarea polipeptidei ActRII sau ALK4. Exemple de astfel de domenii de detectare includ diferitele proteine fluorescente (*de exemplu*, GFP), precum și "etichete de epitop", care sunt uzual secvențe peptidice scurte pentru care este disponibil un anticorp specific. Etichetele de epitop bine-cunoscute pentru care anticorpii monoclonali specifici sunt ușor disponibili includ FLAG, hemaglutinina (HA) a virusului gripal și etichetele c-myc. În unele cazuri, domeniile de fuziune au un situs de scindare a proteazei, cum ar fi Factorul Xa sau trombina, care îi permite proteazei relevante să digere parțial proteinele de fuziune și astfel să elibereze proteinele recombinante din acestea. Proteinele eliberate pot fi apoi izolate din domeniul de fuziune prin separarea cromatografică ulterioară. Alte tipuri de domenii de fuziune care pot fi selectate includ domenii de multimerizante (*de exemplu*, dimerizare, tetramerizare) și domenii funcționale (care conferă o funcție biologică suplimentară) incluzând, de exemplu, domenii constante de la imunoglobuline (*de exemplu*, domenii Fc).

În anumite cazuri, polipeptidele ActRII și ALK4 conform prezentei dezvoltării conțin una sau mai multe modificări care sunt capabile să "stabilizeze" polipeptidele. Prin "stabilizare" se înțelege orice crește timpul de înjumătățire *in vitro*, timpul de înjumătățire serică, indiferent dacă acesta se datorează distrugerii scăzute, clearance-ului scăzut din rinichi sau altor efecte farmacocinetice ale agentului. De exemplu, astfel de modificări sporesc durata de valabilitate a polipeptidelor, sporesc timpul de înjumătățire circulator al polipeptidelor și/sau reduc degradarea proteolitică a polipeptidelor. Astfel de modificări stabilizatoare includ, dar nu se limitează la acestea, proteine de fuziune (incluzând, de exemplu, proteine de fuziune care cuprind un domeniu polipeptidic ActRII (sau polipeptida ALK4) și un domeniu stabilizator), modificări ale unui situs de glicozilare (incluzând, de exemplu, adăugarea unui situs de glicozilare la o polipeptidă conform dezvoltării) și modificări ale fragmentului de carbohidrat (incluzând, de exemplu, îndepărtarea fragmentelor de carbohidrat dintr-o polipeptidă conform dezvoltării). Așa cum se utilizează aici, termenul "domeniu stabilizator" nu se referă numai la un domeniu de fuziune (*de exemplu*, un domeniu Fc al imunoglobulinei) ca în cazul proteinelor de fuziune, ci include și modificări neproteice, cum ar fi un fragment de carbohidrat sau un fragment neproteic, cum ar fi polietilen glicol. În anumite cazuri preferate, o polipeptidă ActRII (sau polipeptidă ALK4) este fuzionată cu un domeniu heterolog care stabilizează polipeptida (un domeniu "stabilizator"), de preferință un domeniu heterolog care crește stabilitatea *in vivo* a polipeptidei. Fuziunile cu un domeniu constant al unei imunoglobuline (*de exemplu*, un domeniu Fc) sunt cunoscute pentru faptul că ar conferi proprietăți

farmacocinetice dorite unei game largi de proteine. Similar, fuziunile cu albumina serică umană pot conferi proprietăți dorite.

Un exemplu de secvență de aminoacizi nativi care poate fi utilizată pentru porțiunea Fc a IgG1 uman (G1Fc) este prezentat mai jos (SEQ ID NO: 14). Sublinierea cu linie punctată indică regiunea de balama, și sublinierea cu linie continuă indică pozițiile cu variante care apar natural. În parte, dezvăluirea redă polipeptide care conțin, constau în esență sau constau din secvențe de aminoacizi cu 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu SEQ ID NO: 14. Variantele naturale din G1Fc ar putea include E134D și M136L conform sistemului de numerotare utilizat în SEQ ID NO: 14 (vezi Uniprot P01857).

```

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 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 14)

```

Opțional, domeniul IgG1 Fc are una sau mai multe mutații la reziduuri precum Asp-265, lizină 322 și Asn-434. În anumite cazuri, domeniul mutant de IgG1 Fc având una sau mai multe dintre aceste mutații (*de exemplu*, mutația Asp-265) are o capacitate redusă de legare la receptorul Fcγ în raport cu un domeniu Fc de tip sălbatic. În alte cazuri, domeniul Fc mutant având una sau mai multe dintre aceste mutații (*de exemplu*, mutația Asn-434) are o capacitate crescută de legare la receptorul de Fc (FcRN) legat de clasa I MHC în raport cu un domeniu Fc de IgG1 de tip sălbatic.

Un exemplu de secvență de aminoacizi nativi care poate fi utilizată pentru porțiunea de Fc a IgG2 umană (G2Fc) este prezentat mai jos (SEQ ID NO: 15). Sublinierea cu linie punctată indică regiunea balamalei, iar sublinierea cu linie dublă indică pozițiile în care există conflicte de baze de date în secvență (conform UniProt P01859). În parte, dezvăluirea furnizează polipeptide care cuprind, constau în esență sau constau din secvențe de aminoacizi cu 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate cu SEQ ID NO: 15.

```

1  VECPCPPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 15)

```

Două exemple de secvențe de aminoacizi care pot fi utilizate pentru porțiunea Fc a IgG3 umană (G3Fc) sunt prezentate mai jos. Regiunea de balama din G3Fc poate fi de până la patru ori mai lungă decât în alte lanțuri de Fc și conține trei segmente identice de 15 reziduuri precedate de un segment similar de 17 reziduuri. Prima secvență G3Fc prezentată mai jos (SEQ ID NO: 16) conține o regiune scurtă de balama constând dintr-un singur segment de 15 reziduuri, în timp ce a doua secvență G3Fc (SEQ ID NO: 17) conține o regiune de balama pe toată lungimea. În fiecare caz, sublinierea cu linie punctată indică regiunea balamalei, iar sublinierea cu linie continuă indică poziții cu variante care apar natural în conformitate cu UniProt P01859. În parte, dezvăluirea furnizează polipeptide care cuprind, constau în esență sau constau din secvențe de aminoacizi cu 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate la SEQ ID NO: 16 și 17.

```
1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 16)
```

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

17)

Variantele de G3Fc care apar natural (de exemplu, vezi Uniprot P01860) includ E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y atunci când sunt convertite la sistemul de numerotare utilizat în SEQ ID NO: 16 și prezenta dezvoltarea furnizează proteine de fuziune cuprinzând domenii G3Fc care conțin una sau mai multe dintre aceste variații. În plus, gena IgG3 a imunoglobulinei umane (*IGHG3*) prezintă un polimorfism structural caracterizat prin diferite lungimi ale balamalei [vezi Uniprot P01859]. Specific, variantei WIS îi lipsește cea mai mare parte a regiunii V și întreaga regiune CH1. Are o legătură disulfurică inter-lanț suplimentară la poziția 7 în plus față de cele 11 prezente în mod normal în regiunea de balama. Variantei ZUC îi lipsește cea mai mare parte a regiunii V, toată regiunea CH1 și o parte a balamalei. Varianta OMM poate reprezenta o formă alelică sau o altă subclasă a lanțului gamma. Prezenta dezvoltare redă proteine de fuziune suplimentare care cuprind domenii G3Fc ce conțin una sau mai multe dintre aceste variante.

Un exemplu de secvență de aminoacizi nativi care poate fi utilizată pentru porțiunea Fc a IgG4 umană (G4Fc) este prezentat mai jos (SEQ ID NO: 18). Sublinierea cu linie punctată indică regiunea de balama. În parte, dezvoltarea redă polipeptide care cuprind, constau în esență sau constau din secvențe de aminoacizi cu 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate la SEQ ID NO: 18.

```
1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 18)
```

O varietate de mutații proiectate în domeniul Fc sunt prezentate aici față de secvența de G1Fc (SEQ ID NO: 14), și mutațiile analoage din G2Fc, G3Fc și G4Fc pot fi derivate din alinierea lor cu G1Fc în Figura 4. Datorită lungimilor inegale ale balamalelor, pozițiile Fc analoage bazate pe alinierea izotipului (Figura 4) posedă diferite numere de aminoacizi în SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 și 18. Se poate aprecia, de asemenea, că o anumită poziție a unui aminoacid într-o secvență de imunoglobulină constând din regiunile de balama, CH2, și CH3 (de exemplu, SEQ ID NO: 14, 15, 16,

17 și 18) vor fi identificate printr-un număr diferit decât aceeași poziție atunci când numerotarea cuprinde întregul domeniu constant al lanțului greu de IgG1 (format din regiuni C_H1, balama, C_H2, și C_H3) ca în baza de date Uniprot. De exemplu, corespondența dintre pozițiile C_H3 selectate într-o secvență G1Fc umană (SEQ ID NO: 14), domeniul constant al lanțului greu de IgG1 uman (Uniprot P01857) și al lanțului greu de IgG1 uman este după cum urmează.

Corespondența pozițiilor C _H 3 în diferite sisteme de numerotare		
G1Fc (Numerotarea începe la prima treonină în regiunea de balama)	Domeniul constant al lanțului greu al IgG1 (numerotarea începe de la C _H 1)	Lanț greu de IgG1 (schema de numerotare EU a lui Kabat și colab., 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 și colab. (editori) 1991; pag. 688-696 în *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, ediția a 5-a, Vol. 1, NIH, Bethesda, MD

În anumite cazuri, polipeptidele dezvoltate aici pot forma complecși proteici cuprinzând cel puțin o polipeptidă ALK4 asociată, covalent sau necovalent, cu cel puțin o polipeptidă ActRIIB. De preferință, polipeptidele dezvoltate aici formează complecși heterodimerice, deși sunt incluși și complecșii heteromultimerici de ordin superior (heteromultimeri), cum ar fi, dar fără a se limita la, heterotrimeri, heterotetrameri și alte structuri oligomere (vezi, de exemplu, Figura 21-23). În unele cazuri, polipeptidele ALK4 și/sau ActRIIB cuprind cel puțin un domeniu de multimerizare. După cum este dezvoltat aici, termenul "domeniu de multimerizare" se referă la un aminoacid sau o secvență de aminoacizi care promovează interacțiunea covalentă sau necovalentă între cel puțin o primă polipeptidă și cel puțin o a doua polipeptidă. Polipeptidele descrise aici pot fi asociate covalent sau necovalent la un domeniu de multimerizare. De preferință, un domeniu de multimerizare promovează interacțiunea între o primă polipeptidă (*de exemplu*, o polipeptidă ALK4) și o a doua polipeptidă (*de exemplu*, o polipeptidă ActRIIB) pentru a promova formarea heteromultimerilor (*de exemplu*, formarea heterodimerilor) și, opțional, împiedică sau defavorizează în alt mod formarea homomultimerului (*de exemplu*, formarea homodimerului), crescând astfel randamentul heteromultimerului dorit (vezi, de exemplu, Figura 22).

Pentru a genera heteromultimerii ALK4:ActRIIB pot fi utilizate multe metode cunoscute în domeniu. De exemplu, legăturile disulfidice care nu apar natural pot fi construite prin înlocuirea pe o primă polipeptidă (*de exemplu*, o polipeptidă ALK4) un aminoacid natural cu un reziduu care conține tiol liber, cum ar fi cisteina, astfel încât tiolul liber interacționează cu un alt reziduu care conține tiol liber pe o a doua

polipeptidă (*de exemplu*, o polipeptidă ActRIIB) astfel încât se formează o legătură de disulfură între prima și a doua polipeptidă. Exemple suplimentare de interacțiuni pentru promovarea formării de heteromultimeri includ, dar nu se limitează la, interacțiuni ionice, cum sunt descrise în Kjaergaard *și colab.*, WO2007147901; efecte de direcționare electrostatice, așa cum sunt descrise în Kannan *și colab.*, U.S.8,592,562; interacțiuni spirală-spirală, cum este descris în Christensen *și colab.*, U.S.20120302737; fermoare de leucină, așa cum este descris în Pack & Plueckthun, (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584; și motive elice-elice întoarsă precum cele descrise în Pack *și colab.*, (1993) *Bio/Technology* 11: 1271-1277. Legătura diferitelor segmente poate fi obținută, *de exemplu*, prin legare covalentă, cum ar fi prin reticulare chimică, linkerii peptidici, punți de disulfură, *etc.*, sau interacțiuni de afinitate, cum ar fi tehnologia cu fermoar avidin-biotină sau leucină.

În anumite cazuri, un domeniu de multimerizare poate cuprinde o componentă a unei perechi de interacțiune. În unele cazuri, polipeptidele dezvăluite aici pot forma complecși proteici cuprinzând o primă polipeptidă asociată covalent sau necovalent cu o a doua polipeptidă, în care prima polipeptidă cuprinde secvența de aminoacizi a unei polipeptide ALK4 și secvența de aminoacizi a unui prim membru al unei perechi de interacțiune; și a doua polipeptidă cuprinde secvența de aminoacizi a unei polipeptide ActRIIB și secvența de aminoacizi a unui al doilea membru al unei perechi de interacțiune. Perechea de interacțiune poate fi oricare două secvențe polipeptidice care interacționează pentru a forma un complex, în special un complex heterodimeric, deși cazurile operative pot utiliza, de asemenea, o pereche de interacțiune care poate forma un complex homodimeric. Un membru al perechii de interacțiune poate fi fuzionat cu o polipeptidă ALK4 sau ActRIIB așa cum este descris aici, incluzând, de exemplu, o secvență polipeptidică cuprinzând, constând în esență sau constând dintr-o secvență de aminoacizi care este cel puțin de 70%, 75%, 80 %, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identică cu secvența oricăreia dintre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 101 și 103. O pereche de interacțiune poate fi selectată pentru a conferi o proprietate/activitate îmbunătățită, cum ar fi creșterea timpului de înjumătățire serică sau pentru a acționa un adaptor pe care este atașat un alt fragment pentru a oferi o proprietate/activitate îmbunătățită. De exemplu, o porțiune de polietilen glicol poate fi atașată la una sau la ambele componente ale unei perechi de interacțiune pentru a oferi o proprietate/activitate îmbunătățită, cum ar fi un timp de înjumătățire serică îmbunătățit.

Primul și al doilea membru al perechii de interacțiune pot fi o pereche asimetrică, ceea ce înseamnă că membrii perechii se asociază preferențial între ei, mai degrabă decât să se auto-asocieze. În consecință, primul și al doilea membru al unei perechi de interacțiune asimetrică se pot asocia pentru a forma un complex heterodimeric (vezi, de exemplu, Figura 22). Alternativ, perechea de interacțiune poate fi neghidată, ceea ce înseamnă că membrii perechii se pot asocia între ei sau se pot auto-asocia fără preferințe substanțiale și, prin urmare, pot avea aceleași secvențe de aminoacizi sau unele diferite. În consecință, primul și al doilea membru al unei perechi de interacțiune neghidată se pot asocia pentru a forma un complex homodimeric sau un complex heterodimeric. Opțional, primul membru al perechii de interacțiune (*de exemplu*, o pereche asimetrică sau o pereche de interacțiune neghidată) se asociază covalent cu al doilea membru al perechii de interacțiune. Opțional, primul membru al perechii de interacțiune (*de exemplu*, o pereche asimetrică sau o pereche de interacțiune neghidată) se asociază non-covalent cu al doilea membru al perechii de interacțiune.

Ca exemple specifice, prezenta dezvoltare redă proteine de fuziune care cuprind ALK4 sau ActRIIB fuzionate la o polipeptidă cuprinzând un domeniu constant al unei imunoglobuline, cum ar fi un domeniu CH1, CH2 sau CH3 derivat din IgG1, IgG2, IgG3 și/sau IgG4 uman, care a fost modificat pentru a promova formarea heteromultimerilor. O problemă care apare în producția pe scară largă de proteine asimetrice pe bază de imunoglobulină dintr-o singură linie celulară este cunoscută sub numele de "problema asocierii lanțului". Așa cum se confruntă în mod evident producția de anticorpi bispecifici, problema asocierii lanțului se referă la provocarea de a produce eficient o proteină multi-lanț dorită din combinațiile multiple care rezultă inerent atunci când diferite lanțuri grele și/sau lanțuri ușoare sunt produse într-o singură linie celulară [Klein și colab (2012) mAbs 4:653-663]. Această problemă este cea mai acută atunci când două lanțuri grele diferite și două lanțuri ușoare diferite sunt produse în aceeași celulă, caz în care există un total de 16 combinații posibile de lanțuri (deși unele dintre acestea sunt identice) atunci când se dorește, tipic, una. Cu toate acestea, același principiu explică randamentul scăzut al unei proteine de fuziune cu mai multe lanțuri dorite, care încorporează numai două lanțuri grele diferite (asimetrice).

Sunt cunoscute în domeniu diferite metode care măresc asocierea dorită a lanțurilor polipeptidice de fuziune care conțin Fc într-o singură linie celulară pentru a produce o proteină de fuziune asimetrică, preferată, cu randamente acceptabile [Klein și colab (2012) mAbs 4:653-663; și Spiess și colab (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]. Metodele de a se obține asocierea dorită a lanțurilor care conțin Fc includ, dar nu se limitează la, asocierea pe bază de sarcină (direcționare electrostatică), asocierea sterică "butoane-în-butonieră", asocierea SEEDbody și asocierea cu fermoar de leucină [Ridgway și colab. (1996) Protein Eng 9: 617-621; Merchant și colab. (1998) Nat Biotech 16: 677-681; Davis și colab. (2010) Protein Eng Des Sel 23: 195-202; Gunasekaran și colab. (2010); 285: 19637-19646; Wranik și colab. (2012) J Biol Chem 287: 43331-43339; US5932448; WO 1993/011162; WO 2009/089004, și WO 2011/034605]. Așa cum este descris aici, aceste metode pot fi utilizate pentru a genera complecși heteromultimeri ALK4-Fc:ActRIIB-Fc. Vezi, de exemplu, Figura 23.

Heteromultimerii ALK4:ActRIIB și metoda de fabricare a acestor heteromultimeri au fost dezvoltate anterior. Vezi, de exemplu, WO 2016/164497.

Se înțelege că diferite elemente ale proteinelor de fuziune (*de exemplu*, proteine de fuziune Fc de imunoglobulină) pot fi aranjate în orice mod care este în concordanță cu funcționalitatea dorită. De exemplu, un domeniu de polipeptidă ActRII (sau polipeptidă ALK4) poate fi plasat C-terminal într-un domeniu heterolog sau, alternativ, un domeniu heterolog poate fi plasat C-terminal într-un domeniu de polipeptidă ActRII (sau polipeptidă ALK4). Domeniul polipeptidic ActRII (sau polipeptida ALK4) și domeniul heterolog nu trebuie să fie adiacente într-o proteină de fuziune și domeniul suplimentare sau secvențe de aminoacizi pot fi incluse C- sau N-terminal fie în domeniu, fie între domenii.

De exemplu, o proteină de fuziune a receptorului de ActRII (sau ALK4) poate cuprinde o secvență de aminoacizi așa cum este stabilit în formula A-B-C. Porțiunea B corespunde unui domeniu polipeptidic ActRII (sau ALK4). Porțiunile A și C pot fi independente zero, unul sau mai mulți aminoacizi și atât porțiunile A cât și C atunci când sunt prezente sunt heteroloage față de B. Porțiunile A și/sau C pot fi atașate la porțiunea B printr-o secvență linker. Un linker poate fi bogat în glicină (*de exemplu*, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 resturi de glicină) sau resturi de glicină și prolină și poate, de exemplu, să conțină o singură secvență de treonină/serină și glicină sau secvențe repetate de treonină/serină și/sau glicină, *de exemplu*, GGG (SEQ ID NO: 19), GGGG (SEQ ID

NO: 20), TGGGG (SEQ ID NO: 21), SGGGG (SEQ ID NO: 22), TGGG (SEQ ID NO: 23), SGGG (SEQ ID NO : 24), sau GGGGS (SEQ ID NO: 25) singleturi, sau repetiții. În anumite cazuri, o proteină de fuziune ActRII (sau ALK4) cuprinde o secvență de aminoacizi așa cum este stabilită în formula A-B-C, în care A este o secvență lider (semnal), B constă dintr-un domeniu polipeptidic ActRII (sau ALK4) și C este o porțiune polipeptidică care îmbunătățește una sau mai multe dintre stabilitate *in vivo*, timpul de înjumătățire *in vivo*, absorbția/administrarea, localizarea sau distribuția țesutului, formarea complexilor proteici și/sau purificarea. În anumite cazuri, o proteină de fuziune ActRII (sau ALK4) cuprinde o secvență de aminoacizi așa cum este stabilită în formula A-B-C, în care A este o secvență lider TPA, B constă dintr-un domeniu polipeptidic al receptorului de ActRII (sau ALK4) și C este un domeniul Fc al imunoglobulinei. Proteinele de fuziune preferate cuprind secvența de aminoacizi prezentată în oricare dintre SEQ ID NO: 32, 36, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 69, 74, 77, 78, 108, 110, 111, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 122 și 124.

În cazuri preferate, polipeptidele ActRII, polipeptidele ALK4 și heteromultimerii ALK4:ActRIIB care trebuie utilizați în conformitate cu metodele descrise aici sunt polipeptide izolate. Așa cum se utilizează aici, o proteină sau polipeptidă izolată este una care a fost separată de o componentă a mediului său natural. În unele cazuri, o polipeptidă conform dezvoltării este purificată până la o puritate mai mare de 95%, 96%, 97%, 98% sau 99%, determinată prin, de exemplu, electroforetic (*de exemplu*, SDS-PAGE, focalizare izoelectrică (IEF), electroforeză capilară) sau cromatografică (de exemplu, schimb de ioni sau HPLC cu fază inversă). Metodele de evaluare a purității sunt bine cunoscute în domeniu [vezi, *de exemplu*, Flatman și colab., (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87]. În unele cazuri, polipeptidele ActRII, polipeptidele ALK4 și heteromultimerii ALK4:ActRIIB care trebuie utilizați în conformitate cu metodele descrise aici sunt polipeptide recombinante.

Polipeptidele ActRII, polipeptidele ALK4 și heteromultimerii ALK4:ActRIIB conform dezvoltării pot fi produși printr-o varietate de tehnici cunoscute în domeniu. De exemplu, polipeptidele din dezvoltare pot fi sintetizate folosind tehnici standard de chimie a proteinelor, precum cele descrise în Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) și Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman și Company, New York (1992). În plus, sintetizatoare automatizate de peptide sunt disponibile comercial (*de exemplu*, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativ, polipeptidele din dezvoltare, inclusiv fragmente sau variante ale acestora, pot fi produse recombinant folosind diverse sisteme de exprimare [*de exemplu*, E. coli, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), celule COS, baculovirus] așa cum este bine cunoscut în domeniu. Într-un alt caz, polipeptidele modificate sau nemodificate conform dezvoltării pot fi produse prin digestia polipeptidelor ActRII cu lungime completă produse recombinant utilizând, de exemplu, o protează, *de exemplu*, tripsină, termolizină, chimotripsină, pepsină sau enzima de conversie aminoacizi bazici pereche (PACE). Analiza computerizată (folosind un software disponibil comercial, *de exemplu*, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) poate fi utilizată pentru a identifica situsurile de scindare proteolitică. Alternativ, astfel de polipeptide pot fi produse din polipeptide ActRII sau ALK4 generate recombinant cu lungime completă folosind clivajul chimic (*de exemplu*, bromură de cianogen, hidroxilamină etc.).

3. Acizi nucleici care codifică polipeptide ActRII și ALK4 și variante ale acestora

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare redă acizi nucleici izolați și/sau recombinanți care codifică polipeptide ActRII și/sau ALK4 (inclusiv fragmente, variante funcționale și proteine de fuziune ale acestora). De exemplu, SEQ ID NO: 7 codifică o

polipeptidă precursoră de ActRIIB uman care apare în mod natural (variantea R64 descrisă mai sus), în timp ce SEQ ID NO: 8 codifică domeniul extracelular procesat al ActRIIB (variantea R64 descrisă mai sus). Acizii nucleici care fac subiectul de față pot fi monocatenari sau bicatenari. Astfel de acizi nucleici pot fi molecule de ADN sau ARN. Acești acizi nucleici pot fi utilizați, de exemplu, în metode pentru obținerea polipeptidelor capcană de ligand pe bază de ActRII așa cum este descris aici.

Așa cum se utilizează aici, acidul (acizii) nucleic(i) (izolat(i)) se referă la o moleculă de acid nucleic care a fost separată de o componentă a mediului său natural. Un acid nucleic izolat include o moleculă de acid nucleic conținută în celule care conțin în mod obișnuit molecula de acid nucleic, dar molecula de acid nucleic este prezentă extracromozomial sau într-o locație cromozomială diferită de locația sa cromozomială naturală.

În anumite cazuri, acizii nucleici care codifică polipeptidele ActRII sau ALK4 conform dezvoltării se înțeleg ca incluzând acizi nucleici care sunt variante ale oricăreia dintre SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135. Secvențele de nucleotide variabile includ secvențe care diferă de unul sau mai multe substituții, aditii sau deleții de nucleotide incluzând variante alelice și, prin urmare, vor include secvența de codificare care diferă de secvența nucleotidică desemnată în oricare dintre SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135.

În anumite cazuri, polipeptidele ActRII sau ALK4 conform dezvoltării sunt codificate de secvențe de acid nucleic izolate și/sau recombinante care sunt cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identice cu oricare dintre SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135. Un specialist în domeniu va aprecia acele secvențe de acid nucleic care sunt cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identice cu secvențe complementare la SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135, și variante ale acestora, fac parte, de asemenea, din scopul prezentei dezvoltării. În alte cazuri, secvențele de acid nucleic conform dezvoltării pot fi izolate, recombinante și/sau fuzionate cu o secvență de nucleotide heteroloage sau într-o bibliotecă de ADN.

În alte cazuri, acizii nucleici conform prezentei dezvoltării includ, de asemenea, secvențe de nucleotide care hibridizează în condiții foarte stringente cu secvența de nucleotide desemnată în SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135, completează secvențele SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135, sau fragmente ale acestora. După cum a fost discutat mai sus, un specialist în domeniu va înțelege cu ușurință că, condițiile adecvate de stringență care promovează hibridizarea ADN pot fi variate. Un specialist în domeniu va înțelege cu ușurință că condițiile adecvate de stringență care promovează hibridizarea ADN pot fi variate. De exemplu, s-ar putea efectua hibridizarea la 6,0 x clorură de sodiu/citrat de sodiu (SSC) la aproximativ 45°C, urmată de o spălare cu 2,0 x SSC la 50°C. De exemplu, concentrația de sare în etapa de spălare poate fi selectată dintr-o stringență scăzută de aproximativ 2,0 x SSC la 50°C până la o stringență ridicată de aproximativ 0,2 x SSC la 50°C. În plus, temperatura în etapa de spălare poate fi crescută de la condiții de stringență scăzută la temperatura camerei, aproximativ 22°C, la condiții de stringență ridicată la aproximativ 65°C. Atât temperatura cât și sarea pot fi variate sau temperatura sau concentrația de sare pot fi

menținute constante în timp ce cealaltă variabilă este schimbată. Într-un caz, dezvoltarea furnizează acizi nucleici care hibridizează în condiții de stringență scăzută de 6 x SSC la temperatura camerei, urmată de o spălare la 2 x SSC la temperatura camerei.

Acizii nucleici izolați care diferă de acizii nucleici așa cum este stabilit în SEQ ID NO: 7, 8, 12, 13, 37, 43, 49, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 102, 103, 106, 107, 109, 112, 119, 121, 123 și 135 la degenerarea în codul genetic fac parte, de asemenea, din scopul dezvoltării. De exemplu, un număr de aminoacizi sunt desemnați prin mai mult de un triplet. Codonii care specifică același aminoacid sau sinonime (de exemplu, CAU și CAC sunt sinonime pentru histidină) pot avea ca rezultat mutații "silenzioase" care nu afectează secvența de aminoacizi a proteinei. Cu toate acestea, este de așteptat ca polimorfisme ale secvenței ADN care conduc la modificări ale secvențelor de aminoacizi ale proteinelor subiect vor exista printre celulele de mamifere. Un specialist în domeniu va aprecia că aceste variații într-una sau mai multe nucleotide (până la aproximativ 3-5% din nucleotide) ale acizilor nucleici care codifică o anumită proteină pot exista între indivizii unei specii date datorită variației alelice naturale. Oricare și toate astfel de variații de nucleotide și polimorfismele rezultate ale aminoacizilor fac parte din scopul acestei dezvoltări.

În anumite cazuri, acizii nucleici recombinanți conform prezentei dezvoltării pot fi legați în mod operațional de una sau mai multe secvențe de nucleotide reglatoare într-un construct de exprimare. Secvențele de nucleotide reglatoare vor fi în general adecvate pentru celula gazdă utilizată pentru exprimare. Numeroase tipuri de vectori de exprimare corespunzători și secvențe reglatoare adecvate sunt cunoscute în domeniu și pot fi utilizate într-o varietate de celule gazdă. De obicei, una sau mai multe secvențe de nucleotide reglatoare pot include, dar nu sunt limitate la, secvențe promotor, secvențe lider sau semnal, situsuri de legare ribozomală, secvențe de pornire și de terminare transcripționale, secvențe de pornire și terminare translaționale și secvențe de amplificator sau activator. Promotorii constitutivi sau inductibili, cunoscuți în domeniu, sunt luați în considerare în dezvoltare. Promotorii pot fi fie promotori naturali, fie promotori hibridi care combină elemente ale mai multor promotori. Un construct de exprimare poate fi prezent într-o celulă pe un episom, cum ar fi o plasmidă, sau constructul de exprimare poate fi inserat într-un cromozom. În unele cazuri, vectorul de exprimare conține o genă marker selectabilă pentru a permite selectarea celulelor gazdă transformate. Genele marker selectabile sunt bine cunoscute în domeniu și pot varia în funcție de celula gazdă utilizată.

În anumite cazuri, acidul nucleic care este subiectul dezvoltării de aici este furnizat într-un vector de exprimare cuprinzând o secvență de nucleotide care codifică o polipeptidă ActRII și/sau ALK4 și este legată operațional cel puțin de o secvență reglatoare. Secvențele reglatoare sunt recunoscute în domeniu și sunt selectate pentru exprimarea directă a polipeptidei ActRII și/sau ALK4. În consecință, termenul secvență reglatoare include promotori, amplificatori și alte elemente de control a exprimării. Secvențe reglatoare exemplare sunt descrise în Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). De exemplu, oricare dintre o mare varietate de secvențe de control a exprimării care controlează exprimarea unei secvențe de ADN atunci când este legată operativ de aceasta poate fi utilizată în acești vectori pentru a exprima secvențe de ADN care codifică o polipeptidă ActRII și/sau ALK4. Astfel de secvențe de control utile a exprimării includ, de exemplu, promotorii timpurii și tardivi ai SV40, promotorul *tet*, promotorul timpuriu imediat de adenovirus sau citomegalovirus, promotorii RSV, sistemul lac, sistemul *trp*, sistemul TAC sau TRC, promotorul T7 a cărui exprimare este

direcționată de ARN polimeraza T7, principalele regiuni de operator și promotor ale fagului lambda, regiunile de control pentru proteina de acoperire fd, promotorul pentru 3-fosfoglicerat kinază sau alte enzime glicolitice, promotorii ai fosfatazei acide, de exemplu, Pho5, promotorii factorilor α de împerechere a drojdiei, promotorul poliedru al sistemului de baculovirus și alte secvențe cunoscute pentru controlul exprimării genelor celulelor procariote sau eucariote sau a virusurilor acestora și a diverselor combinații ale acestora. Ar trebui să se înțeleagă că proiectarea vectorului de exprimare poate depinde de factori precum alegerea celulei gazdă care urmează să fie transformată și/sau tipul de proteină care se dorește a fi exprimată. Mai mult, ar trebui luate în considerare și numărul copiei vectorului, capacitatea de a controla acel număr de copiere și exprimarea oricărei alte proteine codificate de vector, cum ar fi markerii antibiotici.

Un acid nucleic recombinant conform prezentei dezvăluiri poate fi produs prin ligarea genei clonate sau a unei porțiuni a acesteia, într-un vector adecvat pentru exprimare fie în celule procariote, fie în celule eucariote (drojdie, aviară, insectă sau mamifer), fie ambele. Vehiculele de exprimare pentru producerea unei polipeptide ActRII recombinante și/sau ALK4 includ plasmide și alți vectori. De exemplu, vectorii adecvați includ plasmide de următoarele tipuri: plasmide derivate din pBR322, plasmide derivate din pEMBL, plasmide derivate din pEX, plasmide derivate din pBTac și plasmide derivate din pUC pentru exprimare în celule procariote, cum ar fi *E coli*.

Unii vectori de exprimare a mamiferelor conțin atât secvențe procariote pentru a facilita propagarea vectorului în bacterii, cât și una sau mai multe unități de transcripție eucariote care sunt exprimate în celule eucariote. Vectorii derivați de pcADNI/amp, pcADNI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo și pHyg sunt exemple de vectori de exprimare de mamifere adecvate pentru transfecția celulelor eucariote. Unii dintre acești vectori sunt modificați cu secvențe din plasmide bacteriene, cum ar fi pBR322, pentru a facilita replicarea și selectarea rezistenței la medicamente atât în celulele procariote, cât și în celulele eucariote. Alternativ, derivații de virusuri precum virusul papilomului bovin (BPV-1) sau virusul Epstein-Barr (pHEBo, derivat din pREP și p205) pot fi utilizați pentru exprimarea tranzitorie a proteinelor în celulele eucariote. Exemple de alte sisteme de exprimare virale (inclusiv retrovirale) pot fi găsite mai jos în descrierea sistemelor de administrare a terapiei genice. Diferitele metode utilizate în prepararea plasmidelor și în transformarea organismelor gazdă sunt bine cunoscute în domeniu. Pentru alte sisteme de exprimare adecvate atât pentru celulele procariote, cât și pentru celulele eucariote, precum și pentru procedurile generale recombinante, vezi, *de exemplu*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch și Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). În unele cazuri, poate fi de dorit să se exprime polipeptidele recombinante prin utilizarea unui sistem de exprimare a baculovirusului. Exemple de astfel de sisteme de exprimare a baculovirusului includ vectori derivați de pVL (cum ar fi pVL1392, pVL1393 și pVL941), vectori derivați de pAcUW (cum ar fi pAcUW1) și vectori derivați de pBlueBac (cum ar fi β -gal care conține pBlueBac III).

Într-un caz preferat, un vector va fi proiectat pentru producerea polipeptide ActRII și/sau ALK4 în cauză în celule CHO, cum ar fi un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectori pcADN4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) și vectori pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). După cum va fi evident, construcții genei în cauză pot fi utilizați pentru a provoca exprimarea polipeptidelor ActRII în cauză în celule propagate în cultură, *de exemplu*, pentru a produce proteine, inclusiv proteine de fuziune sau variante de proteine, pentru purificare.

Această dezvoltare se referă, de asemenea, la o celulă gazdă transfectată cu o genă recombinantă care include o secvență de codificare pentru una sau mai multe dintre polipeptidele ActRII și/sau ALK4 în cauză. Celula gazdă poate fi orice celulă procariotă sau eucariotă. De exemplu, o polipeptidă ActRII și/sau ALK4 conform dezvoltării poate fi exprimată în celule bacteriene, cum ar fi *E coli*, celule de insecte (*de exemplu*, folosind un sistem de exprimare baculovirus), drojdie sau celule de mamifere [*de exemplu*, o linie celulară de ovar de hamster chinezesc (CHO)]. Alte celule gazdă adecvate sunt cunoscute specialiștilor în domeniu.

În consecință, prezenta dezvoltare se referă în continuare la metode de producere a polipeptidelor ActRII și/sau ALK4 în cauză. De exemplu, o celulă gazdă transfectată cu un vector de exprimare care codifică o polipeptidă ActRII și/sau ALK4 poate fi cultivată în condiții adecvate pentru a permite exprimarea polipeptidei ActRII și/sau ALK4. Polipeptida poate fi secretată și izolată dintr-un amestec de celule și mediu care conține polipeptida. Alternativ, polipeptida ActRII și/sau ALK4 poate fi reținută citoplasmatic sau într-o fracție de membrană și celulele recoltate, lizate și proteina izolată. O cultură celulară include celule gazdă, medii și alte produse secundare. Mediile adecvate pentru cultura celulelor sunt bine cunoscute în domeniu. Polipeptidele în cauză pot fi izolate din mediul de cultură celulară, celulele gazdă sau ambele, utilizând tehnici cunoscute în domeniu pentru purificarea proteinelor, inclusiv cromatografia cu schimb de ioni, cromatografia de filtrare pe gel, ultrafiltrarea, electroforeza, purificarea prin imunoafinitate cu anticorpi specifici pentru epitopii particulari ai polipeptidelor ActRII și/sau ALK4 și purificarea prin afinitate cu un agent care se leagă la un domeniu fuzionat la polipeptida ActRII (*de exemplu*, o coloană A de proteină poate fi utilizată pentru purificarea unei proteine de fuziune ActRII-Fc și/sau ALK4-Fc). În unele cazuri, polipeptida ActRII și/sau ALK4 este o proteină de fuziune care conține un domeniu care facilitează purificarea acesteia.

În unele cazuri, purificarea se efectuează printr-o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu sefaroză Q, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie cu excludere dimensională și cromatografie cu schimb de cationi. Purificarea ar putea fi completată cu filtrare virală și schimb de tampon. O proteină ActRII și/sau ALK4 poate fi purificată la o puritate de >90%, >95%, >96%, >98% sau >99%, determinată prin cromatografie de excludere dimensională și >90%, >95%, >96%, >98% sau >99% determinată prin SDS PAGE. Nivelul țintă de puritate ar trebui să fie unul suficient pentru a se obține rezultatele dorite în sistemele de mamifere, în special primat neuman, rozătoare (șoareci) și oameni.

Într-un alt caz, o genă de fuziune care codifică o secvență lider de purificare, cum ar fi o secvență a situsului de scindare poli-(His)/enterokinază la capătul N-terminal al porțiunii dorite a polipeptidei ActRII și/sau ALK4 recombinante, poate permite purificarea proteina de fuziune exprimată prin cromatografie de afinitate folosind o rășină metalică Ni²⁺. Secvența lider de purificare poate fi apoi îndepărtată ulterior prin tratament cu enterokinază pentru a furniza polipeptida ActRII și/sau ALK4 purificată. *Vezi, de exemplu*, Hochuli și colab. (1987) J. Chromatography 411:177; și Janknecht și colab. (1991) PNAS USA 88:8972.

Tehnicile de obținere a genelor de fuziune sunt bine cunoscute. În esență, îmbinarea diferitelor fragmente de ADN care codifică diferite secvențe de polipeptide se realizează în conformitate cu tehnicile convenționale, folosind capete terminale terminate teșit sau cu capete terminate în trepte pentru ligare, digestie a enzimei de restricție pentru a asigura capete adecvate, completarea capetelor coezive după caz,

tratament cu fosfatază alcalină pentru evitarea îmbinării nedorite și ligatură enzimatică. Într-un alt caz, gena de fuziune poate fi sintetizată prin tehnici convenționale, inclusiv sintetizatoare automate de ADN. Alternativ, amplificarea PCR a fragmentelor genetice poate fi realizată utilizând primeri ancoră care dau naștere unor ieșituri complementare între două fragmente de gene consecutive care pot fi ulterior recoapte pentru a genera o secvență genică himerică. Vezi, *de exemplu*, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel și colab., John Wiley & Sons: 1992.

4. Antagoniști ai anticorpilor

În anumite cazuri, un antagonist de GDF/BMP care trebuie utilizat în conformitate cu metodele și utilizările dezvăluite aici este un anticorp (anticorp antagonist de GDF/BMP), sau o combinație de anticorpi. Un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi se poate lega, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de ActRII (de exemplu, activină, GDF8, GDF11, BMP6, BMP15, BMP10 și/sau GDF3), receptor de ActRII (ActRIIA și/sau ActRIIB), receptor de tip I (ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau co-receptor. Așa cum este descris aici, anticorpii antagonist de GDF/BMP pot fi utilizați, singuri sau în combinație cu una sau mai multe terapii de susținere sau agenți activi, pentru a trata, preveni sau reduce rata de progresare și/sau severitatea hipertensiunii pulmonare (PH), în special tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității uneia sau mai multor complicații asociate cu PH.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, și/sau activina BE). Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la activină. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de activină (sau anticorp anti-activină) se referă, în general, la un anticorp care se leagă la activină cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în activarea țintirii. În anumite cazuri, gradul de legare a unui anticorp de activină la o proteină non-activină, neînrudită, este mai mică de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai mică de aproximativ 1% din legarea anticorpului la activină măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau alte interacțiuni proteice sau analize de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp de activină se leagă la un epitop al activinei care este conservat printre activina din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-activină se leagă la activina umană. În unele cazuri, un anticorp de activină poate inhiba legarea activinei de un receptor de tip I și/sau de tip II (*de exemplu*, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de activină (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp de activină poate inhiba activina de legarea la un co-receptor de ActRII și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de activină (de exemplu, semnalizarea Smad). Trebuie remarcat faptul că activina A are o secvență omoloagă similară cu activina B și, prin urmare, anticorpii care se leagă la activina A, în unele cazuri, se pot lega și/sau inhiba activina B, care se aplică de asemenea și anticorpilor anti-activină B. În unele cazuri, dezvăluirea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și utilizări ale acestuia, care se leagă la activină și se leagă în continuare de, de exemplu, unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP suplimentari [*de exemplu*, GDF11, GDF8, GDF3, BMP15, BMP10 și BMP6], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptorii. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la activină nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D

mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la activină nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de activină și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă la, de exemplu, unul sau mai mulți liganzi suplimentari ai superfamiliei GDF/BMP [de exemplu, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6 și BMP15], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de activină nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp activină nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin activina B. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi se leagă cel puțin la activina B. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de activină B (sau anticorp anti-activină B) se referă în general la un anticorp care se leagă la activina B cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea activinei B. În anumite cazuri, gradul de legare a unui anticorp de activină B la o proteină non-activină B, care nu este înrudită cu aceasta, este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai puțin de aproximativ 1% din legarea anticorpului la activină măsurat, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau alte interacțiuni proteice sau analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp de activină B se leagă la un epitop al activinei B care este conservat printre activina B din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-activină B se leagă la activina umană B. În unele cazuri, un anticorp de activină B poate inhiba legarea activinei B de un receptor de tip I și/sau de tip II (*de exemplu*, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de activata B (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp de activină B poate inhiba legarea activinei B la un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de activina B (de exemplu, semnalizarea Smad). Trebuie remarcat faptul că activina B are o omologie de secvență similară cu activina A și, prin urmare, anticorpii care se leagă la activina B, în unele cazuri, se pot lega și/sau inhiba activina A. În unele cazuri, dezvoltarea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și utilizările acestuia, care se leagă la activina B și se leagă în continuare, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [*de exemplu*, GDF11, GDF8, GDF3, BMP15, BMP10 și BMP6], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la activina B nu se leagă sau nu se leagă substanțial la BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la activina B nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și la utilizările acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de activină B și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de

GDF/BMP suplimentari [de exemplu, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10 și BMP15], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de activină B nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de activină B nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi, este un anticorp care inhibă cel puțin GDF8. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la GDF8. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de GDF8 (sau anticorp anti-GDF8) se referă în general la un anticorp care se leagă la GDF8 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea GDF8. În anumite cazuri, gradul de legare a unui anticorp de GDF8 la o proteină non-GDF8, neînrudită, este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la GDF8 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteică sau analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp de GDF8 se leagă la un epitop al GDF8 care este conservat printre GDF8 printre diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-GDF8 se leagă la GDF8 uman. În unele cazuri, un anticorp de GDF8 poate inhiba legarea GDF8 de un receptor de tip I și/sau de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de GDF8 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp de GDF8 poate inhiba legarea GDF8 la un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de GDF8 (de exemplu, semnalizarea Smad). Trebuie remarcat faptul că GDF8 are o omologie ridicată a secvenței cu GDF11 și, prin urmare, anticorpul care se leagă la GDF8, în unele cazuri, se pot lega și/sau inhiba GDF11. În unele cazuri, dezvăluirea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și la utilizările acestuia, care se leagă la GDF8 și se leagă în plus de, de exemplu, unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [de exemplu, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF11, GDF3, BMP15, BMP10 și BMP6], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la GDF8 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, de aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la GDF8 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, de aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvăluirea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de GDF8 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10 și BMP15], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de GDF8 nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de GDF8 nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, este un anticorp care inhibă cel puțin GDF11. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la GDF11. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de GDF11 (sau anticorp anti-GDF11) se referă în general la un anticorp care se leagă la GDF11 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea GDF11. În anumite cazuri, gradul de legare a unui anticorp de la o proteină non-GDF11 neînrudită, este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2 %, sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la GDF11 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau alte interacțiuni proteice sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp de GDF11 se leagă la un epitop al GDF11 care este conservat printre GDF11 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-GDF11 se leagă la GDF11 uman. În unele cazuri, un anticorp de GDF11 poate inhiba legarea GDF11 de un receptor de tip I și/sau de tip II (*de exemplu*, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de GDF11 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp GDF11 poate inhiba legarea GDF11 de un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de GDF11 (de exemplu, semnalizarea Smad). Trebuie remarcat faptul că GDF11 are o omologie de secvență ridicată la GDF8 și, prin urmare, anticorpul care se leagă la GDF11, în unele cazuri, se pot lega și/sau inhiba GDF8. În unele cazuri, dezvoltarea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și la utilizările acestuia, care se leagă la GDF11 și se leagă în continuare, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF3, BMP15, BMP10 și BMP6], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la GDF11 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la GDF11 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și la utilizarea acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de GDF11 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [*de exemplu*, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF3, BMP6, BMP10 și BMP15], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp GDF11 nu cuprinde un anticorp BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp GDF11 nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin BMP6. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la BMP6. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de BMP6 (sau anticorp anti-BMP6) se referă în general la un anticorp care se poate lega de BMP6 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea BMP6.

În anumite cazuri, gradul de legare a unui anticorp BMP6 la o proteină non-BMP6 neînrudită, este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la BMP6 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau alte interacțiuni proteice sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp BMP6 se leagă la un epitop al BMP6 care este conservat printre BMP6 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-BMP6 se leagă la BMP6 uman. În unele cazuri, un anticorp de BMP6 poate inhiba legarea BMP6 la un receptor de tip I și/sau de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de BMP6 (de exemplu semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp de BMP6 poate inhiba legarea BMP6 de un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de BMP6 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și utilizări ale acestuia, care se leagă la BMP6 și se leagă în plus, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF3, BMP15, BMP10 și GDF11], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la BMP6 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la BMP6 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp BMP6 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [de exemplu, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF11, GDF3, BMP10 și BMP15], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de BMP6 nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de BMP6 nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin GDF3. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la GDF3. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de GDF3 (sau anticorp anti-GDF3) se referă în general la un anticorp care se poate lega de GDF3 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea GDF3. În anumite cazuri, gradul de legare a unui anticorp de GDF3 la o proteină non-GDF3 neînrudită, este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la GDF3 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau alte interacțiuni proteice sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp de GDF3 se leagă la un epitop al GDF3 care este conservat printre GDF3 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-GDF3 se leagă la GDF3 uman. În unele cazuri, un anticorp de GDF3 poate inhiba legarea GDF3 de un receptor de tip I și/sau de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de

GDF3 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp de GDF3 poate inhiba legarea GDF3 la un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de GDF3 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, un anticorp bi-specific) și utilizări ale acestuia, care se leagă la GDF3 și se leagă în continuare, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, BMP6, BMP 15, BMP10 și GDF11], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la GDF3 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la GDF3 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de GDF3 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE, activina BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 și BMP15], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de GDF3 nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de GDF3 nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin BMP15. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la BMP15. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de BMP15 (sau anticorp anti-BMP15) se referă în general la un anticorp care se poate lega la BMP15 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea BMP15. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp BMP15 la o proteină non-BMP15 neînrudită este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la BMP15 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau alte interacțiuni proteice sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp de BMP15 se leagă la un epitop al BMP15 care este conservat printre BMP15 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-BMP15 se leagă la BMP15 uman. În unele cazuri, un anticorp BMP15 poate inhiba legarea BMP15 la un receptor de tip I și/sau tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel inhibă semnalizarea mediată de BMP15 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp de BMP15 poate inhiba legarea BMP15 la un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de BMP15 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și utilizări ale acestuia, care se leagă la BMP 15 și se leagă în plus, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE), GDF8, GDF11, GDF3, BMP10 și BMP6], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptorii de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7)

și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la BMP15 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la BMP15 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvăluirea se referă la combinații de anticorpi și la utilizarea acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de BMP15 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE), GDF8, GDF3 BMP6, BMP10 și GDF11], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptorii de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de BMP15 nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de BMP15 nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, este un anticorp care inhibă cel puțin BMP10. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la BMP10. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de BMP10 (sau anticorp anti-BMP10) se referă în general la un anticorp care se poate lega la BMP10 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea BMP10. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp BMP10 la o proteină non-BMP10 neînrudită este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la BMP10 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteică sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp BMP10 se leagă la un epitop al BMP10 care este conservat printre BMP10 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-BMP10 se leagă la BMP10 uman. În unele cazuri, un anticorp BMP10 poate inhiba BMP10 de legarea la un receptor de tip I și/sau tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de BMP10 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, un anticorp BMP10 poate inhiba legarea BMP10 la un co-receptor și astfel poate inhiba semnalizarea mediată de BMP10 (de exemplu, semnalizarea Smad). În unele cazuri, dezvăluirea se referă la un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) și utilizări ale acestuia, care se leagă la BMP10 și se leagă în continuare, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE), GDF8, GDF11, GDF3 și BMP6], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la BMP10 nu se leagă sau nu se leagă substanțial de BMP9 (de exemplu, se leagă la BMP9 cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, un anticorp multispecific care se leagă la BMP10 nu se leagă sau nu se leagă substanțial la activina A (de exemplu, se leagă la activina A cu o K_D mai mare de 1×10^{-7} M sau are o legătură relativ modestă, de exemplu, aproximativ 1×10^{-8} M sau aproximativ 1×10^{-9} M). În unele cazuri, dezvăluirea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp de BMP10 și unul sau

mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP suplimentari [de exemplu, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE), GDF8, GDF3 BMP6, BMP10 și GDF11], unul sau mai mulți receptori de tip I și/sau receptorii de tip II (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau unul sau mai mulți co-receptori. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de BMP10 nu cuprinde un anticorp de BMP9. În unele cazuri, o combinație de anticorpi care cuprinde un anticorp de BMP10 nu cuprinde un anticorp de activină A.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin ActRIIB. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi se leagă cel puțin la ActRIIB. Așa cum se utilizează aici, un anticorp ActRIIB (anticorp anti-ActRIIB) se referă, în general, la un anticorp care se leagă la ActRIIB cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea ActRIIB. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp anti-ActRIIB la o proteină neînrudită cu ActRIIB este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, sau mai puțin de aproximativ 1% din legarea anticorpului la ActRIIB măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteină-proteină sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp anti-ActRIIB se leagă la un epitop al ActRIIB care este conservat printre ActRIIB din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-ActRIIB se leagă la ActRIIB uman. În unele cazuri, un anticorp anti-ActRIIB poate inhiba unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [de exemplu, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) GDF11, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15] de la legarea la ActRIIB. În unele cazuri, un anticorp anti-ActRIIB este un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) care se leagă la ActRIIB și unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [de exemplu, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC) GDF3, BMP6 și BMP10], receptor de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7), co-receptor și/sau un receptor suplimentar de tip II (de exemplu, ActRIIA). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și la utilizarea acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp anti-ActRIIB și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [de exemplu, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) BMP6, GDF3 și BMP10], co-receptori, receptori de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau receptori suplimentari de tip II (de exemplu, ActRIIA). Trebuie remarcat faptul că ActRIIB are similitudinea secvenței cu ActRIIA și, prin urmare, anticorpii care se leagă la ActRIIB, în unele cazuri, se pot lega și/sau inhiba ActRIIA.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin ActRIIA. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi se leagă cel puțin la ActRIIA. Așa cum se utilizează aici, un anticorp ActRIIA (anticorp anti-ActRIIA) se referă în general la un anticorp care se leagă la ActRIIA cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea ActRIIA. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp anti-ActRIIA la o proteină non-ActRIIA neînrudită este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% sau mai puțin de aproximativ 1% din legarea anticorpului la ActRIIA măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteină-proteină sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp anti-ActRIIA se

leagă la un epitop al ActRIIA care este conservat printre ActRIIA din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-ActRIIA se leagă la ActRIIA uman. În unele cazuri, un anticorp anti-ActRIIA poate inhiba unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [*de exemplu*, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) GDF11, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15] împotriva legării la ActRIIA. În unele cazuri, un anticorp anti-ActRIIA este un anticorp multispecific (de exemplu, anticorp bi-specific) care se leagă la ActRIIA și unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC) GDF3, BMP6 și BMP10], receptor de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7), co-receptor și/sau un receptor suplimentar de tip II (de exemplu, ActRIIB). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp anti-ActRIIA și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) BMP6 și BMP10], co-receptori, receptori de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7) și/sau receptori suplimentari de tip II (de exemplu, ActRIIB). Trebuie remarcat faptul că ActRIIA are similaritate de secvență cu ActRIIB și, prin urmare, anticorpii care se leagă la ActRIIA, în unele cazuri, se pot lega și/sau inhiba ActRIIB.

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin ALK4. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi se leagă cel puțin de ALK4. Așa cum se utilizează aici, un anticorp ALK4 (anticorp anti-ALK4) se referă în general la un anticorp care se leagă la ALK4 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea ALK4. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp anti-ALK4 la o proteină neînrudită cu ALK4 este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% sau mai puțin de aproximativ 1% din legarea anticorpului la ALK4 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteină-proteină sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp anti-ALK4 se leagă la un epitop al ALK4 care este conservat printre ALK4 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-ALK4 se leagă la ALK4 uman. În unele cazuri, un anticorp anti-ALK4 poate inhiba unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) GDF11, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15] împotriva legării la ALK4. În unele cazuri, un anticorp anti-ALK4 este un anticorp multispecific (de exemplu, un anticorp bi-specific) care se leagă la ALK4 și unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activină B, activină C, activină E, activină AB, activină AC) GDF3, BMP6 și BMP10], un receptor de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB), co-receptor, și/sau un receptor suplimentar de tip I (de exemplu, ALK5 și/sau ALK7). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp anti-ALK4 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) BMP6 și BMP10], co-receptori, receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB) și/sau receptori suplimentari de tip I (de exemplu, ALK5 și/sau ALK7).

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin ALK5. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la ALK5. Așa cum se utilizează aici, un anticorp ALK5 (anticorp anti-ALK5) se referă în general la un anticorp care se leagă la ALK5 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea ALK5. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp anti-ALK5 la o proteină neînrudită cu ALK5 este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la ALK5 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteină-proteină sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp anti-ALK5 se leagă la un epitop al ALK5 care este conservat printre ALK5 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-ALK5 se leagă la ALK5 uman. În unele cazuri, un anticorp anti-ALK5 poate inhiba unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) GDF11, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15] împotriva legării la ALK5. În unele cazuri, un anticorp anti-ALK5 este un anticorp multispecific (de exemplu, un anticorp bi-specific) care se leagă la ALK5 și unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC) GDF3, BMP6 și BMP10], un receptor de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB), un co-receptor, și/sau un receptor suplimentar de tip I (de exemplu, ALK4 și/sau ALK7). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp anti-ALK5 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) BMP6 și BMP10], co-receptori, receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB) și/sau receptori suplimentari de tip I (de exemplu, ALK4 și/sau ALK7).

În anumite cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP sau o combinație de anticorpi este un anticorp care inhibă cel puțin ALK7. Prin urmare, în unele cazuri, un anticorp antagonist de GDF/BMP, sau o combinație de anticorpi, se leagă cel puțin la ALK7. Așa cum se utilizează aici, un anticorp de ALK7 (anticorp anti-ALK7) se referă în general la un anticorp care se leagă la ALK7 cu o afinitate suficientă, astfel încât anticorpul este util ca agent de diagnostic și/sau terapeutic în țintirea ALK7. În anumite cazuri, gradul de legare al unui anticorp anti-ALK7 la o proteină non-ALK7 neînrudită este mai mic de aproximativ 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% sau mai mic de aproximativ 1% din legarea anticorpului la ALK7 măsurată, de exemplu, printr-o analiză radioimunologică (RIA), Biacore sau altă interacțiune proteină-proteină sau o analiză de afinitate de legare. În anumite cazuri, un anticorp anti-ALK7 se leagă la un epitop al ALK7 care este conservat printre ALK7 din diferite specii. În anumite cazuri preferate, un anticorp anti-ALK7 se leagă la ALK7 uman. În unele cazuri, un anticorp anti-ALK7 poate inhiba unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) GDF11, BMP6, GDF3, BMP10 și BMP15] împotriva legării la ALK7. În unele cazuri, un anticorp anti-ALK7 este un anticorp multispecific (de exemplu, un anticorp bi-specific) care se leagă la ALK7 și unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC) GDF3, BMP6 și BMP10], un receptor de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB), un co-receptor

și/sau un receptor suplimentar de tip I (de exemplu, ALK4 și/sau ALK5). În unele cazuri, dezvoltarea se referă la combinații de anticorpi și utilizări ale acestora, în care combinația de anticorpi cuprinde un anticorp anti-ALK7 și unul sau mai mulți anticorpi suplimentari care se leagă, de exemplu, la unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, GDF11, GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și activina BE) BMP6 și BMP10], co-receptori, receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB) și/sau receptori suplimentari de tip I (de exemplu, ALK4 și/sau ALK5).

Termenul anticorp se utilizează aici în sensul cel mai larg și cuprinde diverse structuri de anticorpi, incluzând dar fără a se limita la anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali, anticorpi multispecifici (de exemplu, anticorpi bispecifici) și fragmente de anticorpi, atâta timp cât prezintă activitatea de legare a antigenului dorită. Un fragment de anticorp se referă la o altă moleculă decât un anticorp intact care cuprinde o porțiune a unui anticorp intact care leagă la antigenul de care se leagă anticorpul intact. Exemple de fragmente de anticorpi includ, dar nu se limitează la acestea, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacorpi; anticorpi liniari; molecule de anticorp cu un singur lanț (de exemplu, scFv); și anticorpi multispecifici formați din fragmente de anticorpi [*vezi, de exemplu*, Hudson și colab. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Plückthun, în *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg și Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pag. 269-315 (1994); WO 93/16185; și Brevetele S.U.A. nr. 5.571.894; 5.587.458; și 5.869.046]. Diacorpii sunt fragmente de anticorpi cu două situsuri de legare a antigenului care pot fi bivalente sau bispecifice [*vezi, de exemplu*, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson și colab. (2003) Nat. Med. 9:129-134 (2003); și Hollinger și colab. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]. Triacorpii și tetracorpii sunt, de asemenea, descriși în Hudson și colab. (2003) Nat. Med. 9: 129-134. Anticorpii cu un singur domeniu sunt fragmente de anticorpi care cuprind tot sau o parte din domeniul variabil cu lanț greu sau tot sau o parte din domeniul variabil cu lanț ușor al unui anticorp. În anumite cazuri, un anticorp cu un singur domeniu este un anticorp cu un singur domeniu uman [*vezi, de exemplu*, Brev. S.U.A. nr. 6.248.516]. Anticorpii dezvoltăți aici pot fi anticorpi policlonali sau anticorpi monoclonali. În anumite cazuri, anticorpii din prezenta descriere cuprind o etichetă atașată la acesta și care poate fi detectată (*de exemplu*, eticheta poate fi un radioizotop, compus fluorescent, enzimă sau co-factor enzimatic). În anumite cazuri preferate, anticorpii din prezenta dezvoltare sunt anticorpi izolați. În anumite cazuri preferate, anticorpii din prezenta dezvoltare sunt anticorpi recombinanți.

Anticorpii de aici pot fi de orice clasă. Clasa unui anticorp se referă la tipul de domeniu constant sau regiune constantă pe care o are lanțul său greu. Există cinci clase majore de anticorpi: IgA, IgD, IgE, IgG, și IgM, și mai mulți dintre aceștia pot fi împărțiți în continuare în subclase (izotipuri), de exemplu, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ și IgA₂. Domeniile constante ale lanțului greu care corespund diferitelor clase de imunoglobuline se numesc alfa, delta, epsilon, gama și mu.

În general, un anticorp pentru utilizare în metodele dezvoltate aici se leagă specific la antigenul său țintă, de preferință cu afinitate de legare mare. Afinitatea poate fi exprimată ca o valoare K_D și reflectă afinitatea de legare intrinsecă (de exemplu, cu efecte de aviditate minimizate). Tipic, se măsoară afinitatea de legare *in vitro*, indiferent dacă este într-un cadru fără celule sau asociat celulei. Oricare dintre o serie de teste cunoscute în domeniu, inclusiv cele dezvoltate aici, pot fi utilizate pentru a se obține măsurători de afinitate de legare incluzând, de exemplu, Biacore, analiză de legare a antigenului radioetichetat (RIA) și ELISA. În unele cazuri, anticorpii conform prezentei dezvoltări se leagă la antigenii țintă (de exemplu, ActRIIB, ActRIIA, ALK4, ALK5, ALK7,

activină, GDF11, GDF8, GDF3, BMP15, BMP10 și/sau BMP6) cel puțin cu o K_D de 1×10^{-7} sau mai puternic, 1×10^{-8} sau mai puternic, 1×10^{-9} sau mai puternic, 1×10^{-10} sau mai puternic, 1×10^{-11} sau mai puternic, 1×10^{-12} sau mai puternic, 1×10^{-13} sau mai puternic sau 1×10^{-14} sau mai puternic.

În anumite cazuri, K_D se măsoară prin RIA efectuată cu versiunea Fab a unui anticorp de interes și antigenul său țintă, așa cum este descris prin următoarea analiză. Afinitatea de legare a soluției de Fab pentru antigen este măsurată prin echilibrarea Fab cu o concentrație minimă de antigen radioetichetat (*de exemplu*, etichetat cu ^{125}I) în prezența unei serii de titrare a antigenului nemarcat, captând apoi antigenul legat cu o placă acoperită cu anticorp anti-Fab [vezi, *de exemplu*, Chen și colab. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]. Pentru a stabili condițiile pentru analiză, plăci cu mai multe godeuri (*de exemplu*, MICROTITER® de la Thermo Scientific) sunt acoperite (*de exemplu*, peste noapte) cu un anticorp de captare anti-Fab (de exemplu, de la Cappel Labs) și ulterior blocat cu albumină serică de bovină, de preferință la temperatura camerei (aproximativ 23°C). Într-o placă non-adsorbantă, antigenul radioetichetat este amestecat cu diluții în serie ale unui Fab de interes [de exemplu, în concordanță cu evaluarea anticorpului anti-VEGF, Fab-12, în Presta și colab., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]. Fab-ul de interes este apoi incubat, de preferință peste noapte, dar incubarea poate continua pentru o perioadă mai lungă (de exemplu, aproximativ 65 de ore) pentru a se asigura că se atinge echilibrul. Apoi, amestecurile sunt transferate pe placa de captare pentru incubare, de preferință la temperatura camerei timp de aproximativ o oră. Soluția este apoi îndepărtată și placa este spălată de mai multe ori, de preferință cu polisorbitat 20 și amestec de PBS. Când plăcile s-au uscat, se adaugă scintilant (de exemplu, MICROSCINT® de la Packard) și plăcile sunt numărate pe un contor gama (de exemplu, TOPCOUNT® de la Packard).

Conform unui alt caz, K_D este măsurată utilizând analize de rezonanță plasmonică de suprafață utilizând, de exemplu, un BIACORE® 2000 sau un BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) cu cipuri CM5 de antigen imobilizate la aproximativ 10 unități de răspuns (RU). Pe scurt, cipurile de biosenzor dextran carboximetilat (CM5, BIACORE, Inc.) sunt activate cu clorhidrat de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (EDC) și N-hidroxisuccinimidă (NHS) conform instrucțiunilor furnizorului. De exemplu, un antigen poate fi diluat cu 10 mM de acetat de sodiu, pH 4,8, la 5 μg/ml (aproximativ 0,2 μM) înainte de injecție la un debit de 5 μl/minut pentru a se obține aproximativ 10 unități de răspuns (RU) de proteină cuplată. După injectarea antigenului, se injectează etanolamină 1M pentru a bloca grupările nereacționate. Pentru măsurători cinetice, se injectează în PBS diluții seriale de Fab de două ori (0,78 nM până la 500 nM) cu surfactant polisorbitat 20 (TWEEN-20®) 0,05% (PBST) la un debit de aproximativ 25 μl/min. Vitezele de asociere (k_{on}) și vitezele de disociere (k_{off}) sunt calculate utilizând, de exemplu, un simplu model de legare Langmuir unu la unu (BIACORE® Evaluation Software versiunea 3.2) prin potrivirea simultană a sensorgramelor de asociere și disociere. Constanta de disociere la echilibru (K_D) se calculează ca raport k_{off} / k_{on} [vezi, *de exemplu*, Chen și colab., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]. Dacă viteza depășește, de exemplu, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ prin analiza de rezonanță plasmonică de suprafață de mai sus, atunci viteza poate fi determinată utilizând o tehnică de stingere fluorescentă care măsoară creșterea sau scăderea intensității emisiilor de fluorescență (de exemplu, excitație = 295 nm; emisie = 340 nm, trecere de bandă 16 nm) ale unui anticorp anti-antigen de 20 nM (forma Fab) în PBS în prezența unor concentrații crescânde de antigen măsurate într-un spectrometru, cum ar fi un spectrofometru echipat cu stop-flow (Aviv Instruments) sau un spectrofotometru SLM-AMINCO® seria 8000 (ThermoSpectronic) cu o cuvă agitată.

Fragmentele de anticorpi pot fi obținute prin diverse tehnici, incluzând, dar fără a se limita la digestia proteolitică a unui anticorp intact, precum și producerea de către celulele gazdă recombinante (de exemplu, *E. coli* sau fage), așa cum este descris aici. Sunt cunoscute în domeniu secvențele de acid nucleic și aminoacizi ale ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, activina umană (activina A, activina B, activina C și activina E), GDF11, GDF8, BMP15, GDF3, BMP10 și BMP6. În plus, numeroase metode de generare a anticorpilor sunt bine cunoscute în domeniu, dintre care unele sunt descrise aici. Prin urmare, antagoniștii anticorpilor pentru utilizarea în conformitate cu această dezvăluire pot fi obținuți în mod obișnuit de către specialiștii în domeniu pe baza cunoștințelor din domeniu și a învățăturilor furnizate aici.

În anumite cazuri, un anticorp redat aici este un anticorp himeric. Un anticorp himeric se referă la un anticorp în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este derivată dintr-o anumită sursă sau specie, în timp ce restul lanțului greu și/sau ușor este derivată dintr-o sursă sau specie diferită. Anumiți anticorpi himerici sunt descriși, de exemplu, în Brevetele S.U.A. nr. 4.816.567; și Morrison și colab., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855. În unele cazuri, un anticorp himeric cuprinde o regiune variabilă non-umană (*de exemplu*, o regiune variabilă derivată de la un șoarece, șobolan, hamster, iepure sau primată non-umană, cum ar fi o maimuță) și o regiune constantă umană. În unele cazuri, un anticorp himeric este un anticorp "de comutare de clasă" în care clasa sau subclasa a fost schimbată față de cea a anticorpului părinte. În general, anticorpii himerici includ fragmente ale acestora care leagă antigenul.

În anumite cazuri, un anticorp himeric redat aici este un anticorp umanizat. Un anticorp umanizat se referă la un anticorp himeric care cuprinde reziduuri de aminoacizi din regiuni hipervariabile non-umane (HVR-uri) și reziduuri de aminoacizi din regiuni cadru umane (FR-uri). În anumite cazuri, un anticorp umanizat va cuprinde substanțial toate dintre cel puțin unul și, tipic, două domenii variabile, în care toate sau substanțial toate HVR-urile (de exemplu, CDR-urile) corespund celor ale unui anticorp non-uman și toate sau în esență, toate FR-urile corespund celor ale unui anticorp uman. Un anticorp umanizat poate cuprinde opțional cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a anticorpului derivată dintr-un anticorp uman. O "formă umanizată" a unui anticorp, *de exemplu*, un anticorp non-uman, se referă la un anticorp care a suferit umanizare. Anticorpii umanizați și metodele de obținere ale acestora sunt trecute în revistă, de exemplu, în Almagro și Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633 și sunt descrise în plus, de exemplu, în Riechmann și colab., (1988) Nature 332:323-329; Queen și colab. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; Brev. U.S. Pat. Nr. 5,821,337; 7,527,791; 6,982,321; și 7,087,409; Kashmiri și colab., (2005) Methods 36:25-34 [care descriu grefarea SDR (a-CDR)]; Padlan, Mol. Immunol. (1991) 28:489-498 (care descriu "resurfațarea"); Dall'Acqua și colab. (2005) Methods 36:43-60 (care descriu "amestecarea FR"); Osbourn și colab. (2005) Methods 36:61-68; și Klimka și colab. Br. J. Cancer (2000) 83:252-260 (care descriu abordarea prin "selecție ghidată" pentru amestecarea FR). Regiunile cadru umane care pot fi utilizate pentru umanizare includ, dar nu se limitează la: regiuni cadru selectate folosind metoda "cea mai bună potrivire" [vezi, *de exemplu*, Sims și colab. (1993) J. Immunol. 151:2296]; regiuni cadru derivate din secvența consensuală a anticorpilor umani dintr-un anumit subgrup de regiuni variabile ale lanțului ușor sau greu [vezi, *de exemplu*, Carter și colab. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; și Presta și colab. (1993) J. Immunol., 151:2623]; regiuni cadru mature umane (mutate somatic) sau regiuni cadru ale liniei germinale umane [vezi, *de exemplu*, Almagro și Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633]; și regiuni cadru derivate din screening-ul bibliotecilor de FR [vezi, *de exemplu*, Baca și

colab., (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684; și Rosok și colab., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618].

În anumite cazuri, un anticorp redat aici este un anticorp uman. Anticorpul uman pot fi produși folosind diverse tehnici cunoscute în domeniu. Anticorpul uman sunt descriși în general în van Dijk și van de Winkel (2008) Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) și Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459. De exemplu, anticorpul uman pot fi preparați prin administrarea unui imunogen (de exemplu, o polipeptidă GDF11, o polipeptidă activină B, o polipeptidă ActRIIA sau o polipeptidă ActRIIB) la un animal transgenic care a fost modificat pentru a produce anticorpi umani intacti sau anticorpi intacti cu regiuni variabile umane ca răspuns la provocarea antigenică. Astfel de animale conțin în mod obișnuit toate sau o porțiune a locilor de imunoglobulină umană, care înlocuiesc loci de imunoglobulină endogenă sau care sunt prezenți extracromozomial sau integrați aleatoriu în cromozomii animalului. În astfel de animale transgenice, locii de imunoglobulină endogenă au fost în general inactivați. Pentru o trecere în revistă a metodelor de obținere a anticorpilor umani de la animale transgenice, vezi, de exemplu, Lonberg (2005) Nat. Biotech. 23:1117-1125; Brev. U.S. nr. 6,075,181 și 6,150,584 (care descriu tehnologia XENOMOUSE™); Brev. U.S. nr. 5,770,429 (care descrie tehnologia HuMab®); Brev. U.S. nr. 7,041,870 (care descriu tehnologia K-M MOUSE®); și Publicația cererii de Brevet U.S. Nr. 2007/0061900 (care descrie tehnologia VelociMouse®). Regiunile variabile umane din anticorpul intacti generați de astfel de animale pot fi modificate în plus, de exemplu, prin combinarea cu o regiune constantă umană diferită.

Anticorpul uman redați aici pot fi de asemenea produși prin metode bazate pe hibridom. Au fost descrise linii celulare de mielom uman și heteromielom șoarece-om pentru producerea de anticorpi monoclonali umani [vezi, de exemplu, Kozbor J. Immunol., (1984) 133: 3001; Brodeur și colab. (1987) Monoclonal Antibody Production Techniques și Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; și Boerner și colab. (1991) J. Immunol., 147: 86]. Anticorpul uman generați prin tehnologia hibridomului cu celule B umane sunt, de asemenea, descriși în Li și colab., (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562. Metode suplimentare le includ pe cele descrise, de exemplu, în Brev. S.U.A. nr. 7.189.826 (care descrie producerea de anticorpi IgM umani monoclonali din linii celulare de hibridoma) și Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26 (4): 265-268 (2006) (care descrie hibridomi om-om). Tehnologia hibridomului uman (tehnologia Trioma) este de asemenea descrisă în Vollmers și Brandlein (2005) Histol. Histopathol., 20(3):927-937 (2005) și Vollmers și Brandlein (2005) Methods Find Exp. Clin. Pharmacol., 27(3):185-91. Anticorpul uman redați aici pot fi de asemenea generați prin izolarea secvențelor unui domeniu variabil al clonei Fv selectate din bibliotecile de afișare a fagilor derivate de la om. Astfel de secvențe de domeniu variabil pot fi apoi combinate cu un domeniu constant uman dorit. Tehnicile pentru selectarea anticorpilor umani din bibliotecile de anticorpi sunt cunoscute în domeniu și descrise aici.

De exemplu, anticorpul din prezenta dezvoltare pot fi izolați prin screening-ul bibliotecilor combinatorii pentru anticorpi cu activitatea sau activitățile dorite. O varietate de metode sunt cunoscute în domeniu pentru generarea de biblioteci de afișare a fagilor și screening-ul acestor biblioteci pentru anticorpi care posedă caracteristicile de legare dorite. Astfel de metode sunt trecute în revistă, de exemplu, în Hoogenboom și colab. (2001) in Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien și colab., ed., Human Press, Totowa, N.J. și descrise în plus, de exemplu, în McCafferty și colab. (1991) Nature 348:552-554; Clackson și colab., (1991) Nature 352: 624-628; Marks și colab. (1992) J. Mol. Biol. 222:581-597; Marks și Bradbury (2003) in Methods

in Molecular Biology 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu și colab. (2004) J. Mol. Biol. 338(2):299-310; Lee și colab. (2004) J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093; Fellouse (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472; și Lee și colab. (2004) J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132.

În anumite metode de afișare a fagilor, repertoriile genelor VH și VL sunt clonate separat prin reacția în lanț a polimerazei (PCR) și recombinate aleatoriu în biblioteci de fagi, care pot fi apoi selectate pentru detectarea fagului care leagă antigenul, așa cum este descris în Winter și colab. (1994) Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455. Fagii prezintă tipic fragmente de anticorpi, fie ca fragmente Fv (scFv) cu lanț unic, fie ca fragmente Fab. Bibliotecile din surse imunizate furnizează anticorpi cu afinitate ridicată împotriva imunogenului (de exemplu, ActRIIA, ActRIIB, activină, GDF11, GDF8, BMP15, GDF3 sau BMP6) fără necesitatea construirii hibridoamelor. Alternativ, repertoriul naiv poate fi clonat (*de exemplu*, de la om) pentru a furniza o singură sursă de anticorpi pentru o gamă largă de non-auto și, de asemenea, auto-antigeni fără nici o imunizare, așa cum este descris de Griffiths și colab. (1993) EMBO J, 12: 725-734. În cele din urmă, bibliotecile naive pot fi obținute, de asemenea, sintetic, prin clonarea segmentelor de gene V nerearanjate din celulele stem și prin utilizarea primerilor PCR care conțin secvențe aleatorii pentru a codifica regiunile CDR3 puternic variabile și pentru a realiza rearanjarea in vitro, așa cum este descris de Hoogenboom și Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381-388. Publicațiile de brevet care descriu biblioteci de fagi de anticorpi umani includ, de exemplu: Brev. U.S. nr. 5,750,373, și Publicațiile de brevet nr. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 și 2009/0002360.

În anumite cazuri, un anticorp redat aici este un anticorp multispecific, de exemplu, un anticorp bispecific. Anticorpi multispecifici (tipic anticorpi monoclonali) care au specificități de legare cel puțin pentru doi epitopi diferiți (de exemplu, doi, trei, patru, cinci sau șase sau mai mulți) pe unul sau mai mulți (*de exemplu*, doi, trei, patru, cinci, șase sau mai mulți) antigeni.

Tehnicile de producere a anticorpilor multispecifici includ, dar nu se limitează la, coexprimarea recombinantă a două perechi lanț greu/lanț ușor de imunoglobulină având specificități diferite [vezi, *de exemplu*, Milstein și Cuello (1983) Nature 305: 537; Publicația internațională de brevet nr. WO 93/08829; și Trauneker și colab. (1991) EMBO J. 10: 3655, și Brev. U.S. Nr. 5,731,168 (ingineria "buton în gaură")]. Anticorpii multispecifici pot fi, de asemenea, produși prin realizarea efectelor de direcționare electrostatică pentru fabricarea moleculelor de anticorpi Fc-heterodimerici (vezi, *de exemplu*, WO 2009/089004A1); reticularea a doi sau mai mulți anticorpi sau fragmente [vezi, *de exemplu*, Brev. U.S. nr. 4,676,980; și Brennan și colab. (1985) Science, 229: 81]; utilizarea fermoarelor de leucină pentru a produce anticorpi bispecifici [vezi, *de exemplu*, Kostelny și colab. (1992) J. Immunol., 148 (5): 1547-1553]; folosind tehnologia "diacorp" pentru fabricarea fragmentelor de anticorpi bispecifici [vezi, *de exemplu*, Hollinger și colab. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448]; folosind dimeri Fv (sFv) cu lanț unic [vezi, *de exemplu*, Gruber și colab. (1994) J. Immunol., 152:5368]; și prepararea anticorpilor trispecifici (vezi, *de exemplu*, Tutt și colab. (1991) J. Immunol. 147: 60. Anticorpii multispecifici pot fi preparați ca anticorpi cu lungime întregă sau fragmente de anticorpi. Anticorpii proiectați cu trei sau mai multe situsuri funcționale de legare a antigenului, inclusiv "anticorpii Octopus (caracatiță)", sunt de asemenea incluși aici [vezi, *de exemplu*, US 2006/0025576A1].

În anumite cazuri, un anticorp dezvăluit aici este un anticorp monoclonal. Un anticorp monoclonal se referă la un anticorp obținut dintr-o populație de anticorpi substanțial omogeni, *adică* anticorpii individuali care formează populația sunt identici

și/sau leagă același epitop, cu excepția posibilelor variante de anticorpi, *de exemplu*, conținând mutații naturale sau care apar în timpul producției unui preparat de anticorp monoclonal, astfel de variante fiind în general prezente în cantități minore. Spre deosebire de preparatele de anticorpi policlonali, care includ de obicei diferiți anticorpi direcționați împotriva epitopilor diferiți, fiecare anticorp monoclonal al unui preparat de anticorpi monoclonali este direcționat împotriva unui singur epitop de pe un antigen. Astfel, modificatorul "monoclonal" indică caracterul anticorpului ca fiind obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi și nu trebuie interpretat ca necesitând producerea anticorpului prin nicio metodă particulară. De exemplu, anticorpul monoclonal care trebuie utilizat în conformitate cu prezentele metode pot fi fabricați printr-o varietate de tehnici, incluzând, dar fără a se limita la metoda hibridomului, metodele de ADN recombinant, metodele de afișare a fagilor și metodele care utilizează animale transgenice care conțin toate sau o parte a locilor de imunoglobulină umană, astfel de metode și alte metode exemplare pentru producerea anticorpilor monoclonali fiind descrise aici.

De exemplu, prin utilizarea imunogenilor derivați de la activină, antiserurile anti-proteină/anti-peptidă sau anticorpul monoclonal pot fi obținuți prin protocoale standard [vezi, *de exemplu*, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. de Harlow și Lane (1988) Cold Spring Harbor Press: 1988]. Un mamifer, cum ar fi un șoarece, hamster sau iepure, poate fi imunizat cu o formă imunogenă a polipeptidei activină, un fragment antigenic care este capabil să provoace un răspuns de anticorp sau o proteină de fuziune. Tehnicile pentru conferirea imunogenității unei proteine sau peptide includ conjugarea la purtători sau alte tehnici bine cunoscute în domeniu. O porțiune imunogenă dintr-o polipeptidă activină poate fi administrată în prezență de adjuvant. Progresul imunizării poate fi monitorizat prin detectarea titrurilor anticorpilor în plasmă sau ser. ELISA standard sau alte teste imunologice pot fi utilizate cu imunogenul ca antigen pentru a evalua nivelurile de producție de anticorpi și/sau nivelul de afinitate de legare.

După imunizarea unui animal cu un preparat antigenic de activină, se pot obține antiseruri și, dacă se dorește, anticorpul policlonal pot fi izolați din ser. Pentru a produce anticorpi monoclonali, celulele producătoare de anticorpi (limfocite) pot fi recoltate de la un animal imunizat și fuzionate prin proceduri standard de fuziune a celulelor somatice cu celulele imortalizante, cum ar fi celulele de mielom, pentru a produce celule hibridom. Astfel de tehnici sunt bine cunoscute în domeniu și includ, de exemplu, tehnica hibridomului [vezi, *de exemplu*, Kohler și Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-497], tehnica hibridom cu celule B umane [vezi, *de exemplu*, Kozbar și colab. (1983) *Immunology Today*, 4:72] și tehnica EBV-hibridom pentru a produce anticorpi monoclonali umani [Cole și colab. (1985) *Monoclonal Antibodies și Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96]. Celulele hibridom pot fi supuse unui screening imunochimic pentru producerea de anticorpi reactivi specifici cu o polipeptidă activină și anticorpi monoclonali izolați dintr-o cultură cuprinzând astfel de celule hibridom.

În anumite cazuri, una sau mai multe modificări ale aminoacizilor pot fi introduse în regiunea Fc a unui anticorp furnizat aici generând astfel o variantă a regiunii Fc. Varianta regiunii Fc poate cuprinde o secvență de regiune Fc umană (*de exemplu*, o regiune IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4 Fc umană care cuprinde o modificare a aminoacizilor (de exemplu, o substituție, deleție și/sau adiție) la una sau mai multe poziții de aminoacizi.

De exemplu, prezenta dezvăluire are în vedere o variantă de anticorp care posedă unele, dar nu toate funcțiile efectoare, care îl fac un candidat de dorit pentru aplicații în care timpul de înjumătățire al anticorpului *in vivo* este importantă, însă anumite funcții efectoare [*de exemplu*, citotoxicitatea dependentă de complement

(CDC) și citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC)] sunt inutile sau dăunătoare. Analizele de citotoxicitate *in vitro* și/sau *in vivo* pot fi efectuate pentru a confirma reducerea/epuizarea activităților CDC și/sau ADCC. De exemplu, analizele de legare a receptorului de Fc (FcR) pot fi efectuate pentru a se asigura că anticorpului îi lipsește legarea FcγR (deci îi lipsește probabil activitatea ADCC), dar păstrează capacitatea de legare a FcRn. Celulele primare pentru medierea ADCC, celulele NK, exprimă numai FcγRIII, în timp ce monocitele exprimă FcγRI, FcγRII și FcγRIII. Exprimarea FcR pe celulele hematopoietice este rezumată, de exemplu, în Ravetch și Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492. Exemple nelimitative de analize *in vitro* pentru a se evalua activitatea ADCC a unei molecule de interes sunt descrise în Brev. U.S. nr. 5,500,362; Hellstrom, I. și colab. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063]; Hellstrom, I și colab. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; U.S. Brev. nr. 5,821,337; Bruggemann, M. și colab. (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361. Alternativ, pot fi utilizate metode de analiză non-radioactive (de exemplu, ACTI™, analiza de citotoxicitate non-radioactivă pentru citometrie în flux; CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; și CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay, Promega, Madison, Wis.). Celulele efectoare utile pentru astfel de analize includ celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) și celule natural killer (NK). Alternativ sau suplimentar, activitatea ADCC a moleculei de interes poate fi evaluată *in vivo*, de exemplu, într-un model animal precum cel prezentat în Clynes și colab. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656. Analizele de legare a C1q pot fi, de asemenea, efectuate pentru a confirma că anticorpul nu este capabil să se lege de C1q și, prin urmare, este lipsit de activitate CDC [vezi, *de exemplu*, ELISA care leagă C1q și C3c în WO 2006/029879 și WO 2005/100402]. Pentru a se evalua activarea complementului, se poate efectua o analiză CDC [vezi, *de exemplu*, Gazzano-Santoro și colab. (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. și colab. (2003) *Blood* 101:1045-1052; și Cragg, M. S. și M. J. Glennie (2004) *Blood* 103:2738-2743]. Determinări ale legării FcRn și a clearance-ului/timpului de înjumătățire *in vivo* pot fi, de asemenea, efectuate folosind metode cunoscute în domeniu [vezi, *de exemplu*, Petkova, S. B. și colab. (2006) *Intl. Immunol.* 18(12): 1759-1769]. Anticorpii cu funcție efectoare redusă conform prezentei dezvălurii îi includ pe cei cu substituirea unuia sau mai multor reziduuri ale regiunii Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 și 329 (Brev. U.S. nr. 6,737,056). Astfel de mutații Fc includ mutații Fc cu substituții la două sau mai multe poziții de aminoacizii 265, 269, 270, 297 și 327, inclusiv așa-numitul mutant Fc "DANA" cu substituția reziduurilor 265 și 297 la alanină (Brev. U.S. nr. 7,332,581).

În anumite cazuri, poate fi de dorit să se creeze anticorpi modificați la cisteina, *de exemplu*, "tioMAb-uri", în care unul sau mai multe reziduuri ale unui anticorp sunt substituite cu reziduuri de cisteină. În cazuri particulare, reziduurile substituite apar în situsuri accesibile ale anticorpului. Prin înlocuirea acelor reziduuri cu cisteină, grupările tiol reactive sunt astfel poziționate la situsurile accesibile ale anticorpului și pot fi utilizate pentru a conjuga anticorpul cu alte fragmente, cum ar fi fragmente medicamentoase sau fragmente de linker-medicament, pentru a crea un imunoconjugat, așa cum este descris în continuare aici. În anumite cazuri, oricare unul sau mai multe dintre următoarele reziduuri pot fi substituite cu cisteină: V205 (numerotarea Kabat) a lanțului ușor; A118 (numerotare EU) a lanțului greu; și S400 (numerotare EU) din regiunea Fc a lanțului greu. Anticorpii modificați cu cisteină pot fi generați așa cum este descris, de exemplu, în Brev. S.U.A. nr. 7.521.541.

În plus, tehnicile utilizate pentru screeningul anticorpilor pentru a se identifica un anticorp dorit pot influența proprietățile anticorpului obținut. De exemplu, dacă un anticorp trebuie utilizat pentru legarea unui antigen în soluție, poate fi de dorit să se

testeze legarea soluției. O varietate de tehnici diferite sunt disponibile pentru testarea interacțiunilor dintre anticorpi și antigeni pentru a se identifica anticorpii deosebit de dezirabili. Astfel de tehnici includ ELISA, analize de legare prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, analiza de legare Biacore, Biacore AB, Uppsala, Suedia), analize sandwich (de exemplu, sistemul de perle paramagnetice al IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), western blot-uri, analize de imunoprecipitare și imunohistochimie.

În anumite cazuri, sunt avute în vedere variante de secvență de aminoacizi ale anticorpilor și/sau polipeptidele de legare redate aici. De exemplu, poate fi de dorit să se îmbunătățească afinitatea de legare și/sau alte proprietăți biologice ale anticorpului și/sau polipeptidei de legare. Variantele secvenței de aminoacizi ale unui anticorp și/sau polipeptide de legare pot fi preparate prin introducerea unor modificări adecvate în secvența de nucleotide care codifică anticorpul și/sau polipeptida de legare sau prin sinteza peptidelor. Astfel de modificări includ, de exemplu, deleții din și/sau inserții în și/sau substituții ale reziduurilor din secvențele de aminoacizi ale anticorpului și/sau polipeptidei de legare. Poate fi efectuată orice combinație de deleție, inserare și substituție pentru a se ajunge la construcția finală, cu condiția ca, respectiva construcție finală să aibă caracteristicile dorite, *de exemplu*, legarea țintei (de exemplu, și activina cum ar fi activina E și/sau legarea activinei C).

Modificări (de exemplu, substituții) pot fi efectuate în HVR-uri, de exemplu, pentru a se îmbunătăți afinitatea anticorpilor. Astfel de modificări pot fi efectuate în "punctele fierbinți" de HVR *adică* reziduuri codificate de codoni care suferă mutații la frecvență ridicată în timpul procesului de maturare somatică [vezi, *de exemplu*, Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)], și/sau SDR (a-CDR-uri), cu varianta VH sau VL rezultată fiind testată în ceea ce privește afinitatea de legare. Maturizarea afinității prin construirea și reselectarea din biblioteci secundare a fost descrisă în domeniu [vezi, *de exemplu*, Hoogenboom și colab., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien și colab., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)]. În unele cazuri de maturare a afinității, diversitatea este introdusă în genele variabile alese pentru maturare prin oricare dintre o varietate de metode (de exemplu, PCR predispuse la erori, amestecare a lanțului sau mutageneză dirijată de oligonucleotide). Apoi se creează o bibliotecă secundară. Biblioteca este apoi supusă unui screening pentru a se identifica orice variante de anticorpi cu afinitatea dorită. O altă metodă de introducere a diversității implică abordări direcționate de HVR, în care mai multe reziduuri de HVR (de exemplu, 4-6 reziduuri la un moment dat) sunt randomizate. Reziduurile de HVR implicate în legarea antigenului pot fi identificate în mod specific, *de exemplu*, folosind mutagenеза sau modelarea cu scanare de alanină. CDR-H3 și CDR-L3 în special sunt țintite frecvent.

În anumite cazuri, substituții, inserții sau deleții pot apărea în cadrul unuia sau mai multor HVR-uri, atâta timp cât astfel de modificări nu reduc substanțial capacitatea anticorpului de a se lega la antigen. De exemplu, în HVR-uri pot fi efectuate modificări conservative (de exemplu, substituții conservative, așa cum sunt redate aici), care nu reduc substanțial afinitatea de legare. Astfel de modificări pot fi în afara "punctelor fierbinți" sau SDR-urilor HVR. În anumite cazuri ale secvențelor VH și VL variante redate mai sus, fiecare HVR fie nu este modificat, fie nu conține mai mult de una, două sau trei substituții de aminoacizi.

O metodă utilă pentru identificarea reziduurilor sau regiunilor anticorpului și/sau a polipeptidei de legare care pot fi țintite pentru mutagenеза se numește "mutagenеза cu scanare de alanină", așa cum este descris de Cunningham și Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. În această metodă, un reziduu sau un grup de reziduuri țintă (de

exemplu, reziduuri cu sarcină, cum ar fi Arg, Asp, His, Lys și Glu) sunt identificate și înlocuite cu un aminoacid neutru sau încărcat negativ (de exemplu, alanină sau polialanină) pentru a se determina dacă interacțiunea anticorp-antigen este afectată. Alte substituții pot fi introduse la locațiile aminoacizilor, demonstrând sensibilitate funcțională la substituțiile inițiale. Alternativ sau suplimentar, este determinată o structură cristalină a unui complex antigen-anticorp, pentru a se identifica punctele de contact dintre anticorp și antigen. Astfel de reziduuri de contact și reziduuri învecinate pot fi țintite sau eliminate drept candidați la înlocuire. Variantele pot fi supuse unui screening pentru a se determina dacă conțin proprietățile dorite.

Insertiile de secvențe de aminoacizi includ fuziuni de amino- și/sau carboxil-terminale variind ca lungime de la un reziduu la polipeptide care conțin o sută sau mai multe reziduuri, precum și inserții intrasecvențiale de reziduuri de aminoacizi unici sau multipli. Exemple de inserții terminale includ un anticorp cu un reziduu de metionil N-terminal. Alte variante de inserție ale moleculei de anticorp includ fuziunea capătului N- sau C-terminal al anticorpului cu o enzimă (de exemplu, pentru ADEPT) sau o polipeptidă care crește timpul de înjumătățire serică al anticorpului.

În anumite cazuri, un anticorp și/sau polipeptidă de legare redate aici pot fi modificate suplimentar pentru a conține fragmente neproteice suplimentare care sunt cunoscute în domeniu și ușor disponibile. Porțiunile adecvate pentru derivatizarea anticorpului și/sau polipeptidei de legare includ, dar nu sunt limitate la polimeri solubili în apă. Exemple nelimitative de polimeri solubili în apă includ, dar nu se limitează la, polietilenglicol (PEG), copolimeri de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilceluloză, dextran, alcool polivinilic, polivinil pirolidonă, poli-1,3-dioxolan, poli-1,3,6-trioxan, copolimer etilenă/anhidridă maleică, poliaminoacizi (fie homopolimeri, fie copolimeri aleatorii) și dextran sau poli(n-vinil pirolidonă)polietilenglicol, homopolimeri de propilenglicol, copolimeri de prolipropilenoxid/etilenoxid, polioli polioxietilați (de exemplu, glicerol), alcool polivinilic și amestecuri ale acestora. Polietilenglicol-propionaldehida poate avea avantaje în fabricare datorită stabilității sale în apă. Polimerul poate avea orice greutate moleculară și poate fi ramificat sau neramificat. Numărul de polimeri atașați la anticorp și/sau polipeptida de legare poate varia și, dacă sunt atașați mai mult de un polimer, aceștia pot fi aceiași sau molecule diferite. În general, numărul și/sau tipul de polimeri utilizați pentru derivatizare poate fi determinat pe baza unor considerente care includ, dar nu se limitează la, proprietățile sau funcțiile specifice ale anticorpului și/sau polipeptidei de legare care trebuie îmbunătățite, indiferent dacă derivatul anticorpului și/sau derivatul polipeptidic de legare va fi utilizat într-o terapie în condiții definite.

5. Antagoniști cu molecule mici

În alte cazuri, un antagonist de GDF/BMP care trebuie utilizat în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este o moleculă mică (antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică), sau o combinație de antagoniști cu molecule mici. Un antagonist de GDF/BMP cu molecule mici, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, poate inhiba, de exemplu, unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP (de exemplu, activina, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10 și/sau BMP15), un receptor de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7), un receptor de tip II (de exemplu, ActRIIB și/sau ActRIIA), un co-receptor și/sau unul sau mai mulți factori de semnalizare (de exemplu, proteine Smad, cum ar fi Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu molecule mici, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă semnalizarea mediată de unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP, de exemplu, așa cum se determină într-o analiză pe bază de celule, cum ar fi cele descrise aici. Așa cum este descris aici, antagoniștii de GDF/BMP cu molecule mici pot fi utilizați, singuri

sau în combinație cu una sau mai multe terapii de susținere sau agenți activi, pentru a trata, preveni sau reduce viteza de progresare și/sau severitatea hipertensiunii pulmonare (PH), în special tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severității uneia sau mai multor complicații asociate cu PH.

În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin GDF11, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin GDF8, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF11, activină (de exemplu, activina A, activină B, activină C, activină E, activină AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică sau o combinație de antagoniști cu molecule mici inhibă cel puțin activina (activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), opțional inhibând suplimentar una sau mai multe dintre GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin activina B, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin BMP6, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activină B, activină C, activină E, activină AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin BMP15, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activină B, activină C, activină E, activină AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin GDF3, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin BMP10, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin ActRIIA, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina

C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin ActRIIB, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, BMP10, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin ALK4, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, BMP10, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin ALK5, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, BMP10, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, inhibă cel puțin ALK7, opțional inhibând suplimentar unul sau mai multe dintre GDF8, activină (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, BMP10 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică, sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, așa cum este dezvăluit aici, nu inhibă sau nu inhibă substanțial BMP9. În unele cazuri, un antagonist de GDF/BMP cu moleculă mică sau o combinație de antagoniști cu molecule mici, așa cum este dezvăluit aici, nu inhibă sau nu inhibă substanțial activina A.

Antagoniștii de GDF/BMP cu moleculă mică pot fi inhibitori direcți sau indirecti. De exemplu, un antagonist cu molecule mici sau o combinație de antagoniști cu molecule mici indirecti pot inhiba exprimarea (de exemplu, transcripția, translația, secreție celulară sau combinații ale acestora) a cel puțin unuia sau mai multor liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina B, activina BC, activina AE sau activina BE), GDF11, BMP15, BMP6, GDF3, BMP10 și/sau GDF8], receptor de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7), receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB), co-receptor și/sau a uneia sau mai multor componente de semnalizare din aval (de exemplu, Smad-uri). Alternativ, un antagonist cu molecule mici sau o combinație de antagoniști cu molecule mici direcți se pot lega direct și inhiba, de exemplu, unul sau mai mulți unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP [*de exemplu*, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina B, activina BC, activina AE sau activina BE), GDF11, BMP15, BMP6, GDF3, BMP10 și/sau GDF8], receptor de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7), receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB), co-receptor și/sau unul sau mai multe componente de semnalizare din aval (de exemplu, Smad-uri). Combinațiile unuia sau mai multor antagoniști de GDF/BMP cu moleculă mică indirecti și unuia sau mai multor direcți pot fi utilizate în conformitate cu metodele descrise aici.

Antagoniștii cu molecule mici de legare conform prezentei dezvoltării pot fi identificați și sintetizați chimic folosind metodologia cunoscută (*vezi, de exemplu, Publicațiile PCT Nr. WO 00/00823 și WO 00/39585*). În general, antagoniștii cu molecule mici conform dezvoltării au de obicei o dimensiune mai mică de aproximativ 2000 daltoni, alternativ mai mică de aproximativ 1500, 750, 500, 250 sau 200 daltoni, în care astfel de molecule organice mici sunt capabile de legare, preferabil specific, la o polipeptidă așa cum este descris aici. Acești antagoniști cu moleculele mici pot fi identificați fără experimentări nejustificate folosind tehnici bine cunoscute. În acest sens, se remarcă faptul că tehnicile de screening a bibliotecilor organice de molecule mici pentru molecule care sunt capabile să se lege de o țintă polipeptidică sunt bine cunoscute în domeniu (*vezi, de exemplu, publicațiile internaționale de brevet nr. WO00/00823 și WO00/39585*).

Moleculele organice mici de legare din prezenta dezvoltare pot fi, de exemplu, aldehide, cetone, oxime, hidrazone, semicarbazone, carbazide, amine primare, amine secundare, amine terțiare, hidrazine N-substituite, hidrazide, alcooli, eteri, tioli, tioeteri, disulfuri, acizi carboxilici, esteri, amide, uree, carbamați, carbonați, cetali, tiocetali, acetali, tioacetali, halogenuri de aril, aril sulfonați, halogenuri de alchil, alchil sulfonați, compuși aromatici, compuși heterociclici, aniline, alchene, alchine, dioli, amino alcooli, oxazolidine, oxazoline, tiazolidine, tiazoline, enamine, sulfonamide, epoxizi, aziridine, izocianați, cloruri de sulfonil, compuși diazonici și cloruri acide.

6. Antagoniști polinucleotidici

În alte cazuri, un antagonist de GDF/BMP care trebuie utilizat în conformitate cu metodele și utilizările descrise aici este o polinucleotidă (antagonist polinucleotidic de GDF/BMP), sau o combinație de polinucleotide. Un antagonist polinucleotidic de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști polinucleotidici poate inhiba, de exemplu, unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP (de exemplu, activina, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10 și/sau BMP15), receptori de tip I (de exemplu, ALK4, ALK5 și/sau ALK7), receptori de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB), un co-receptor și/sau componentă de semnalizare în aval (de exemplu, Smad-uri). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP, inhibă semnalizarea mediată de unul sau mai mulți liganzi de GDF/BMP, de exemplu, așa cum este determinat într-o analiză pe bază de celule, cum ar fi cele descrise aici. După cum este descris aici, antagoniștii polinucleotidici GDF/BMP pot fi folosiți, singuri sau în combinație cu una sau mai multe terapii de susținere sau agenți activi, pentru a trata, preveni sau reduce viteza de progresare și/sau severitatea hipertensiunii pulmonare (PH), în special tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severității uneia sau mai multor complicații asociate cu PH.

În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic de GDF/BMP sau o combinație de antagoniști polinucleotidici inhibă cel puțin GDF11, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP, inhibă cel puțin GDF8, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF11, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP, inhibă cel puțin activina (activina A, activina B, activina

C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), opțional inhibând suplimentar una sau mai multe dintre GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin activina B, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin BMP6, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, GDF11, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin BMP15, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), GDF3, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin GDF3, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin GDF3, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin ActRIIA, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin ActRIIB, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, BMP10, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin ALK4, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, BMP10, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP inhibă cel puțin ALK5, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE

și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, BMP10, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP, inhibă cel puțin ALK7, opțional inhibând suplimentar unul sau mai mulți dintre GDF8, activina (de exemplu, activina A, activina B, activina C, activina E, activina AB, activina AC, activina BC, activina AE și/sau activina BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, BMP10 și una sau mai multe proteine Smad (de exemplu, Smad-urile 2 și 3). În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP, așa cum este dezvoltat aici, nu inhibă sau nu inhibă substanțial BMP9. În unele cazuri, un antagonist polinucleotidic sau o combinație de antagoniști polinucleotidici de GDF/BMP, așa cum este dezvoltat aici, nu inhibă sau nu inhibă substanțial activina A.

În unele cazuri, antagoniștii polinucleotidici conform dezvoltării pot fi un acid nucleic antisens, o moleculă de ARNi [*de exemplu*, ARN cu interferență mică (ARNsi), ARN ac de păr scurt (ARNsh), microARN (miARN)], un aptamer și/sau un ribozim. Secvențele de acid nucleic și aminoacizi ale proteinelor umane GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina C și activina E), BMP6, GDF3, ActRIIA, ActRIIB, BMP10, ALK4, ALK5, ALK7, BMP15 și Smad sunt cunoscute în domeniu. În plus, multe metode diferite de generare a antagoniștilor polinucleotidici sunt bine cunoscute în domeniu. Prin urmare, antagoniștii polinucleotidici pentru utilizarea în conformitate cu această dezvoltare pot fi obținuți în mod obișnuit de către specialiștii în domeniu pe baza cunoștințelor în domeniu și a învățăturilor furnizate aici.

Tehnologia antisens poate fi utilizată pentru a controla exprimarea genelor prin ADN sau ARN antisens sau prin formarea unei elice triple. Tehnicile antisens sunt discutate, de exemplu, în Okano (1991) *J. Neurochem.* 56:560; *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988). Formarea elicei triple este discutată, de exemplu, în Cooney și colab. (1988) *Science* 241:456; și Dervan și colab., (1991) *Science* 251:1300. Metodele se bazează pe legarea unei polinucleotide la un ADN sau ARN complementar. În unele cazuri, acizii nucleici antisens cuprind un ARN monocatenar sau o secvență de ADN care este complementară cu cel puțin o porțiune a transcriptului de ARN al unei gene descrise aici. Cu toate acestea, complementaritatea absolută, deși preferată, nu este necesară.

O secvență "complementară cu cel puțin o porțiune de ARN", la care se face referire aici, înseamnă o secvență având complementaritate suficientă pentru a putea hibridiza cu ARN-ul, formând un duplex stabil; în cazul acizilor nucleici antisens dublu catenari ai unei gene dezvoltate aici, o singură catenă a ADN-ului duplex poate fi testată astfel sau poate fi testată formarea unui triplex. Capacitatea de hibridizare va depinde atât de gradul de complementaritate, cât și de lungimea acidului nucleic antisens. În general, cu cât acidul nucleic care se hibridizează este mai mare, cu atât poate conține mai multe nepotriviri de baze cu un ARN și mai poate forma încă un duplex stabil (sau triplex după caz). Un specialist în domeniu poate stabili un grad tolerabil de nepotrivire prin utilizarea procedurilor standard pentru a determina punctul de topire al complexului hibridizat.

Polinucleotidele care sunt complementare capătului 5' al mesajului, de exemplu, secvența 5'-netranslatată până la codonul de inițiere AUG inclusiv, ar trebui să funcționeze cel mai eficient la inhibarea translației. Cu toate acestea, s-a dovedit că secvențe complementare secvențelor 3'-netranslate de ARNm sunt eficiente și la inhibarea translației ARNm [*vezi, de exemplu*, Wagner, R., (1994) *Nature* 372:333-335]. Astfel, oligonucleotidele complementare oricăreia dintre regiunile 5' și 3'-netranslate, necodificate ale unei gene din dezvoltare, ar putea fi utilizate într-o

abordare antisens pentru a inhiba translația unui ARNm endogen. Polinucleotidele complementare regiunii 5'-netranslate a ARNm ar trebui să includă complementul codonului de start AUG. Polinucleotidele antisens complementare regiunilor de codificare a ARNm sunt inhibitori mai puțin eficienți ai translației, dar ar putea fi utilizați în conformitate cu metodele prezentei descrieri. Indiferent dacă sunt proiectate pentru a hibridiza la regiunea 5'-, 3'- sau cea de codare a unui ARNm conform dezvoltării, acizii nucleici antisens ar trebui să aibă o lungime cel puțin de șase nucleotide și, de preferință, sunt oligonucleotide cuprinse între 6 și aproximativ 50 nucleotide în lungime. În cazuri specifice oligonucleotida este de cel puțin 10 nucleotide, cel puțin 17 nucleotide, cel puțin 25 de nucleotide sau cel puțin 50 de nucleotide.

Într-un caz, acidul nucleic antisens din prezenta dezvoltare este produs intracelular prin transcripție dintr-o secvență exogenă. De exemplu, un vector sau o porțiune a acestuia este transcris, producând un acid nucleic antisens (ARN) al unei gene conform dezvoltării. Un astfel de vector ar putea conține o secvență care codifică acidul nucleic antisens dorit. Un astfel de vector poate rămâne epizomal sau poate deveni integrat cromozomial, atâta timp cât poate fi transcris pentru a produce ARN-ul antisens dorit. Astfel de vectori pot fi construiți prin metode tehnologice de ADN recombinant standard în domeniu. Vectorii pot fi plasmide, virale sau altele cunoscute în domeniu, utilizate pentru replicare și exprimare în celule de vertebrate. Exprimarea secvenței care codifică genele dorite sau fragmente ale acestora conform prezentei dezvoltării, poate fi făcută de orice promotor cunoscut în domeniu pentru a acționa la vertebrate, preferabil celule umane. Astfel de promotori pot fi inductibili sau constitutivi. Astfel de promotori includ, dar nu se limitează la, regiunea promotorului timpuriu SV40 [vezi, *de exemplu*, Benoist și Chambon (1981) *Nature* 290:304-310], promotorul conținut în repetarea terminală lungă 3' a virusului sarcomului Rous [vezi, *de exemplu*, Yamamoto și colab. (1980) *Cell* 22: 787-797], promotorul de herpes timidină [vezi, *de exemplu*, Wagner și colab. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445], și secvențele reglatoare ale genei metalotioneinei [vezi, *de exemplu*, Brinster și colab. (1982) *Nature* 296: 39-42].

În unele cazuri, antagoniștii polinucleotidici sunt molecule de ARN interferente (ARNi) care țintesc exprimarea unei sau mai multora dintre: GDF11, GDF8, activina (activină A, activină B, activină C și activină E), BMP6, GDF3, ActRIIA, Proteinele ActRIIB, BMP10, ALK4, ALK5, ALK7, BMP15 și Smad. ARNi se referă la exprimarea unui ARN care interferează cu exprimarea ARNm țintit. Specific, ARNi silențiază o genă țintită prin interacțiunea cu ARNm specific printr-un ARNsi (ARN interferent mic). Complexul ARN ds este apoi țintit pentru degradarea de către celulă. O moleculă de ARNsi este un ARN duplex dublu catenar cu o lungime de 10 până la 50 de nucleotide, care interferează cu exprimarea unei gene țintă care este suficient de complementar (de exemplu, cel puțin 80% identitate cu gena). În unele cazuri, molecula de ARNsi cuprinde o secvență de nucleotide care este cel puțin 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 sau 100% identică cu secvența de nucleotide a genei țintă.

Molecule suplimentare de ARNi includ ARN cu ac de păr scurt (ARNsh); de asemenea, ac de păr cu interferență scurtă și microARN (miARN). Molecula de ARNsh conține secvențe sens și antisens de la o genă țintă conectată printr-o buclă. ARNsh este transportat din nucleu în citoplasmă și este degradat împreună cu ARNm. Promotorii Pol III sau U6 pot fi utilizați pentru exprimarea ARN-urilor pentru ARNi. Paddison și colab. [*Genes & Dev.* (2002) 16:948-958, 2002] au folosit molecule mici de ARN pliate în ac de păr ca mijloc de a afecta ARNi. Prin urmare, astfel de molecule de ARN tip ac de păr scurt (ARNsh) sunt de asemenea utilizate avantajos în metodele descrise aici. Lungimea tijei și a buclei de ARNsh funcționale variază; lungimile tijei pot

varia de la aproximativ 25 la aproximativ 30 nt, iar dimensiunea buclei poate varia între 4 și aproximativ 25 nt fără a afecta activitatea de silențiere. Deși nu doresc să fie legați de nicio teorie anume, se crede că aceste ARNsh-uri seamănă cu produsele de ARN dublu catenar (ARNds) ale DICER RNazei și, în orice caz, au aceeași capacitate de inhibare a exprimării unei gene specifice. ARNsh poate fi exprimat dintr-un vector lentiviral. Un miARN este un ARN monocatenar cu o lungime de aproximativ 10 până la 70 de nucleotide care este inițial transcris ca pre-miARN caracterizat printr-o structură "tijă-bucă", care sunt ulterior procesate în miARN matur după procesarea ulterioară prin RISC.

Moleculile care mediază ARNi, incluzând fără limitare ARNsi, pot fi produse in vitro prin sinteză chimică (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), hidroliza ARNds (Yang și colab., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), transcripție *in vitro* cu ARN polimerază T7 (Donzeet și colab., Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu și colab., Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002), și prin hidroliza ARN dublu-catenar utilizând o nuclează cum ar fi E. coli RNaza III (Yang și colab., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002).

Conform unui alt caz, dezvoltarea furnizează antagoniști polinucleotidici care includ, dar nu se limitează la, un ADN momental, un ADN dublu-catenar, un ADN monocatenar, un ADN complexat, un ADN încapsulat, un ADN viral, un ADN plasmidic, un ARN gol, un ARN încapsulat, un ARN viral, un ARN dublu-catenar, o moleculă capabilă să genereze interferență ARN sau combinații ale acestora.

În unele cazuri, antagoniștii polinucleotidici conform dezvoltării sunt aptameri. Aptamerii sunt molecule de acid nucleic, incluzând ADN dublu-catenar și molecule de ARN monocatenar, care se leagă și formează structuri terțiare care se leagă specific la o moleculă țintă. Generarea și utilizarea terapeutică a aptamerilor sunt bine stabilite în domeniu (vezi, *de exemplu*, Brev. U.S. nr. 5,475,096). Informații suplimentare despre aptameri pot fi găsite în Publicația cererii de brevet U.S. Nr. 20060148748. Aptamerii acidului nucleic sunt selectați utilizând metode cunoscute în domeniu, de exemplu prin intermediul procesului Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). SELEX este o metodă pentru evoluția in vitro a moleculelor de acid nucleic cu legare foarte specifică la moleculele țintă așa cum este descris în, *de exemplu*, Brev. S.U.A. nr. 5.475.096; 5.580.737; 5.567.588; 5.707.796; 5.763.177; 6.011.577; și 6.699.843. O altă metodă de screening pentru identificarea aptamerilor este descrisă în Brev. S.U.A. nr. 5.270.163. Procesul SELEX se bazează pe capacitatea acizilor nucleici de a forma o varietate de structuri bidimensionale și tridimensionale, precum și pe versatilitatea chimică disponibilă în cadrul monomerilor nucleotidici de acțiune ca liganzi (formând perechi de legare specifice) cu practic orice compus chimic, fie monomeric, fie polimeric, incluzând alte molecule de acid nucleic și polipeptide. Moleculile de orice dimensiune sau compoziție pot servi drept ținte. Metoda SELEX implică selectarea dintr-un amestec de oligonucleotide candidate și iterații în etape a legării, partiționare și amplificare, utilizând aceeași schemă generală de selecție, pentru a se obține afinitatea și selectivitatea de legare dorite. Pornind de la un amestec de acizi nucleici, care poate cuprinde un segment de secvență randomizată, metoda SELEX include etape de contactare a amestecului cu ținta în condiții favorabile legării; partiționarea acizilor nucleici nelegați din acei acizi nucleici care s-au legat specific la moleculele țintă; disocierea complexelor acid nucleic-țintă; amplificarea acizilor nucleici disociați de la complexii acid nucleic-țintă pentru a produce un amestec de acizi nucleici îmbogățit cu ligand. Etapele de legare, partiționare, disociere și amplificare se repetă prin câte cicluri se dorește pentru a

produce liganzi ai acidului nucleic care se leagă cu afinitate și specificitate ridicate la molecula țintă.

Tipic, astfel de molecule de legare sunt administrate separat la animal [vezi, *de exemplu*, O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560], dar astfel de molecule de legare pot fi exprimate de asemenea și *in vivo* din polinucleotide preluate de o celulă gazdă și exprimate *in vivo* [vezi, *de exemplu*, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)].

7. Folistatină și antagoniști de FLRG

În alte cazuri, un antagonist de GDF/BMP este o folistatină sau o polipeptidă FLRG. Așa cum este descris aici, folistatina și/sau polipeptida FLRG pot fi utilizate pentru a trata, preveni sau reduce viteza de progresare și/sau severitatea hipertensiunii pulmonare (PH), în special tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severitatea uneia sau mai multor complicații asociate cu PH.

Termenul "polipeptidă folistatină" include polipeptide care cuprind orice polipeptidă naturală a folistatinei precum și orice variante ale acesteia (incluzând mutanți, fragmente, fuziuni și forme peptidomimetice) care păstrează o activitate utilă și include în plus orice monomer sau multimer funcțional al folistatinei. În anumite cazuri preferate, polipeptidele folistatinei conform dezvoltării se leagă și/sau inhibă activitatea activinei, în special a activinei A. Variantele de polipeptide folistatinice care păstrează proprietăți de legare la activină pot fi identificate pe baza studiilor anterioare care implică interacțiuni între folistatină și activină. De exemplu, WO2008/030367 dezvoltă domenii specifice de folistatină ("FSD-uri") care s-au dovedit a fi importante pentru legarea activinei. Așa cum este arătat mai jos în SEQ ID NO: 28-30, domeniul N-terminalul folistatinei ("FSND" SEQ ID NO: 28), FSD2 (SEQ ID NO: 30) și într-o măsură mai mică FSD1 (SEQ ID NO: 29) reprezintă domenii exemplare în folistatină care sunt importante pentru legarea activinei. În plus, metodele pentru realizarea și testarea bibliotecilor de polipeptide sunt descrise mai sus în contextul polipeptidelor ActRII și astfel de metode se referă și la fabricarea și testarea variantelor de folistatină. Polipeptidele folistatine includ polipeptide derivate din secvența oricărei folistatine cunoscute având o secvență cel puțin aproximativ 80% identică cu secvența unei polipeptide folistatinice și opțional cel puțin 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau o identitate mai mare. Exemple de polipeptide de folistatină includ polipeptida folistatină matură sau izoforme mai scurte sau alte variante ale polipeptidei precursore a folistatinei umane (SEQ ID NO: 26) așa cum este descris, de exemplu, în WO2005/025601.

Izoforma polipeptidică a precursorului de folistatină umană FST344 este după cum urmează:

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNAYCV TCNRIPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEDE DQDYSFPISS ILEW

```

(SEQ ID NO: 26; NCBI Reference No. NP_037541.1)

Peptida semnal este subliniată; de asemenea, mai sus, sunt subliniate ultimele 27 de reziduuri care reprezintă extensia C-terminală distingând această izoformă de folistatină de izoforma de folistatină mai scurtă FST317 prezentată mai jos.

Izoforma polipeptidei precursorului de folistatină umană FST317 este după cum urmează:

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLCO FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG
RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101  GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR
NECALLKARC
151  KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRCPEPA
201  SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251  TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT
YASECAMKEA
301  ACSSGVLLEV KHSGSCN (SEQ ID NO: 27; NCBI Reference No. NP_006341.1)

```

Peptida semnal este subliniată.

Secvența domeniului N-terminal al folistatinei (FSND) este următoarea: GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN

TLFKWMI FNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 28; FSND)

Secvențele FSD1 și FSD2 sunt după cum urmează:

ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 29; FSD1)

KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVT (SEQ ID NO: 30; FSD2)

În alte cazuri, un agent pentru utilizarea în conformitate cu metodele dezvăluite aici este o genă asemănătoare folistatinei (FLRG), cunoscută și sub numele de proteină 3 înrudită cu folistatina (FSTL3). Termenul "polipeptidă FLRG" include polipeptide care cuprind orice polipeptidă care apare natural a FLRG precum și orice variante ale acesteia (inclusiv mutanți, fragmente, fuziuni și forme peptidomimetice) care păstrează o activitate utilă. În anumite cazuri preferate, polipeptidele FLRG din dezvăluire se leagă și/sau inhibă activitatea activinei, în special a activinei A. Variantele de polipeptide FLRG care păstrează proprietăți de legare la activină pot fi identificate folosind metode de rutină pentru a analiza interacțiunilor între FLRG și activină (vezi, *de exemplu*, US 6,537,966). În plus, metodele pentru realizarea și testarea bibliotecilor de polipeptide sunt descrise mai sus în contextul polipeptidelor ActRII și astfel de metode se referă, de asemenea, la fabricarea și testarea variantelor de FLRG. Polipeptidele FLRG includ polipeptide derivate din secvența oricărei FLRG cunoscute având o secvență cel puțin aproximativ 80% identică cu secvența unei polipeptide FLRG și opțional o identitate de cel puțin de 85%, 90%, 95%, 97%, 99% sau mai mare.

Precursorul polipeptidei FLRG umane (precursorul proteinei 3 înrudite cu folistatina) este după cum urmează:

```

1  MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMSG 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 NO: 31; Nr. referință NCBI NP_005851.1)

```

Peptida semnal este subliniată.

În anumite cazuri, variantele funcționale sau formele modificate ale polipeptidelor folistatine și ale polipeptidelor FLRG includ proteine de fuziune care au cel puțin o porțiune din polipeptida folistatină sau polipeptida FLRG și unul sau mai multe domenii de fuziune, cum ar fi, de exemplu, domenii care facilitează izolarea, detectarea, stabilizarea sau multimerizarea polipeptidei. Domeniile de fuziune adecvate sunt discutate în detaliu mai sus cu referire la polipeptidele ActRII. Într-un anumit caz, un agent antagonist conform dezvoltării este o proteină de fuziune care cuprinde o porțiune de legare a activinei dintr-o polipeptidă folistatină fuzionată la un domeniu Fc. Într-un alt caz, un agent antagonist al dezvoltării este o proteină de fuziune care cuprinde o porțiune de legare a activinei dintr-o polipeptidă FLRG fuzionată la un domeniu Fc.

8. Analize de screening

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare se referă la utilizarea antagoniști de GDF/BMP în cauză (de exemplu, polipeptide ActRII și variante ale acestora) pentru a se identifica compușii (agenți) care pot fi utilizați pentru a trata, preveni sau reduce viteza de progresare și/sau severitatea hipertensiunii pulmonare (PH), în special tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severitatea uneia sau mai multor complicații asociate PH.

Există numeroase abordări ale screening-ului agenților terapeutici pentru tratarea PH prin semnalizarea țintită (de exemplu, semnalizarea Smad) a unuia sau mai multor liganzi de GDF/BMP. În anumite cazuri, screeningul de mare viteză al compușilor poate fi efectuat pentru a se identifica agenții care perturbază efectele mediate de liganzii de GDF/BMP pe o linie celulară selectată. În anumite cazuri, analiza se efectuează pentru a selecta și identifica compușii care inhibă sau reduc în mod specific legarea unui ligand de GDF/BMP (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, GDF3, BMP6, GDF8, GDF15, GDF11 sau BMP10) la partenerul său de legare, cum ar fi un receptor de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB). Alternativ, analiza poate fi utilizată pentru a identifica compușii care sporesc legarea unui ligand de GDF/BMP de partenerul său de legare, cum ar fi un receptor de tip II. Într-un alt caz, compușii pot fi identificați prin capacitatea lor de a interacționa cu un receptor de tip II.

O varietate de formate de testare va fi suficientă și, în lumina prezentei dezvoltării, cele care nu sunt descrise în mod expres aici vor fi totuși înțelese de către un specialist în domeniu. Așa cum este descris aici, compușii de testat (agenții) din dezvoltare pot fi creați prin orice metodă chimică combinatorie. Alternativ, compușii în cauză pot fi biomolecule care apar natural, sintetizate *in vivo* sau *in vitro*. Compușii (agenți) care trebuie testați în ceea ce privește capacitatea lor de a acționa ca modulatori ai creșterii țesuturilor pot fi produși, de exemplu, de bacterii, drojdie, plante sau alte organisme (*de exemplu*, produse naturale), produse chimic (*de exemplu*, molecule mici, inclusiv peptidomimetice), sau produse recombinante. Compușii de testare considerați prin prezenta dezvoltare includ molecule organice non-peptidice, peptide, polipeptide, peptidomimetice, zaharuri, hormoni și molecule de acid nucleic. În anumite cazuri, agentul de testare este o moleculă organică mică având o greutate moleculară mai mică de aproximativ 2.000 de Daltoni.

Compușii de testare conform dezvoltării pot fi furnizați ca entități unice, discrete, sau furnizați în biblioteci de complexitate mai mare, cum ar fi realizate prin chimie combinatorie. Aceste biblioteci pot cuprinde, de exemplu, alcooli, halogenuri de alchil, amine, amide, esteri, aldehide, eteri și alte clase de compuși organici. Prezentarea compușilor de testat la sistemul de testare poate fi fie într-o formă izolată, fie ca amestecuri de compuși, în special în etapele inițiale de screening. Opțional, compușii

pot fi opțional derivatizați cu alți compuși și au grupări de derivatizare care facilitează izolarea compușilor. Exemple nelimitative de grupări de derivatizare includ biotina, fluoresceina, digoxigenina, proteina fluorescentă verde, izotopi, polihistidina, perle magnetice, glutation S-transferaza (GST), agenți de reticulare fotoactivabili sau orice combinații ale acestora.

În multe programe de screening pentru medicamente care testează biblioteci de compuși și extracte naturale, sunt de dorit analize de mare viteză pentru a maximiza numărul de compuși studiați într-o anumită perioadă de timp. Analizele care sunt efectuate în sisteme fără celule, cum ar fi cele derivate cu proteine purificate sau semipurificate, sunt adesea preferate ca screeninguri "primare" prin faptul că pot fi generate pentru a permite dezvoltarea rapidă și detectarea relativ ușoară a unei modificări într-un țintă moleculară care este mediată de un compus de testat. Mai mult, efectele toxicității celulare sau ale biodisponibilității compusului testat pot fi în general ignorate în *in vitro* analiza fiind în schimb, concentrată în primul rând pe efectul medicamentului asupra țintei moleculare, așa cum se poate manifesta într-o modificare a afinității de legare între un ligand de GDF/BMP (de exemplu, activina A, activina B, activina AB, activina C, GDF8, GDF15, GDF11, GDF3, BMP6 sau BMP10) și partenerul său de legare, cum ar fi un receptor de tip II (de exemplu, ActRIIA și/sau ActRIIB).

Numai pentru ilustrare, într-un test de screening exemplar al prezentei dezvoltării, compusul de interes este contactat cu o polipeptidă ActRIIB izolată și purificată, care este în mod obișnuit capabilă să se lege la un ligand de ActRIIB, după cum este adecvat pentru intenția analizei. La amestecul compusului și polipeptidei de ActRIIB se adaugă apoi la o compoziție care conține un ligand de ActRIIB (*de exemplu*, GDF11). Detectarea și cuantificarea complexilor de ligand ActRIIB/ActRIIB oferă un mijloc pentru determinarea eficacității compusului la inhibarea (sau potențarea) formării complexului între polipeptida ActRIIB și proteina sa de legare. Eficacitatea compusului poate fi evaluată prin generarea, din datele obținute, a curbelor doză-răspuns folosind diferite concentrații ale compusului testat. Mai mult, o analiză de control poate fi, de asemenea, efectuată pentru a oferi o linie de bază pentru comparație. De exemplu, într-o analiză de control, ligandul ActRIIB izolat și purificat este adăugat la o compoziție care conține polipeptida ActRIIB, și formarea complexului ActRIIB/ligand de ActRIIB este cuantificată în absența compusului de testat. Se va înțelege că, în general, ordinea în care reactanții pot fi amestecați poate fi variată și pot fi amestecați simultan. Mai mult, în locul proteinelor purificate, se pot utiliza extracte celulare și lizate pentru a se obține un sistem adecvat de testare fără celule.

Formarea complexului între ligandul GDF/BMP și proteina sa de legare poate fi detectată printr-o varietate de tehnici. De exemplu, modularea formării complexilor poate fi cuantificată folosind, de exemplu, proteine etichetate detectabil, cum ar fi etichetate radioactiv (de exemplu, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C sau ^3H), etichetate fluorescent (*de exemplu*, FITC), sau polipeptida ActRIIB etichetată enzimatic și/sau proteina de legare a acesteia, prin imunoanaliză sau prin detectare cromatografică.

În anumite cazuri, prezenta dezvoltării are în vedere utilizarea analizelor de polarizare a fluorescenței și a analizelor de transfer de energie prin rezonanță de fluorescență (FRET) în măsurarea, directă sau indirectă, a gradului de interacțiune dintre un ligand de GDF/BMP și proteina sa de legare. Mai mult, alte moduri de detectare, cum ar fi cele bazate pe ghiduri de unde optice (*vezi, de exemplu*, Publicația PCT WO 96/26432 și Brev. U.S. nr. 5,677,196), rezonanța plasmonică de suprafață (SPR), senzorii de sarcină de suprafață și senzorii de forță de suprafață sunt compatibili cu multe cazuri ale dezvoltării.

Mai mult, prezenta dezvoltare are în vedere utilizarea unei analize de interacțiune capcană, cunoscut și sub denumirea de "analiză cu doi hibridi", pentru identificarea agenților care perturbă sau potențează interacțiunea dintre un ligand de GDF/BMP și partenerul său de legare. Vezi, *de exemplu*, Brev. U.S. nr. 5,283,317; Zervos și colab. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura și colab. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel și colab. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; și Iwabuchi și colab. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). Într-un caz specific, prezenta dezvoltare are în vedere utilizarea unor sisteme inversate cu doi hibridi pentru a identifica compușii (de exemplu, molecule mici sau peptide) care disociază interacțiunile dintre un ligand GDF/BMP și proteina sa de legare [vezi, *de exemplu*, Vidal și Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal și Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; și Brev. S.U.A. nr. 5.525.490; 5.955.280; și 5.965.368].

În anumite cazuri, compușii în cauză sunt identificați prin capacitatea lor de a interacționa cu un ligand de GDF/BMP. Interacțiunea dintre un compus și ligandul de GDF/BMP poate fi covalentă sau necovalentă. De exemplu, o astfel de interacțiune poate fi identificată la nivel de proteină folosind metode biochimice *in vitro*, inclusiv reticularea foto, legarea ligandului radioetichetat și cromatografia de afinitate [vezi, *de exemplu*, Jakoby WB și colab. (1974) *Methods in Enzymology* 46:1]. anumite cazuri, compușii pot fi selectați într-un test bazat pe un mecanism, cum ar fi un test pentru detectarea compușilor care se leagă la un ligand de GDF/BMP. Aceasta poate include un eveniment de legare în fază solidă sau în fază fluidă. Alternativ, gena care codifică ligandul de GDF/BMP poate fi transfectată cu un sistem raportor (de exemplu, β -galactozidază, luciferază sau proteină fluorescentă verde) într-o celulă și supusă unui screening față de bibliotecă, de preferință prin screening de mare viteză sau cu membri individuali ai bibliotecii. Pot fi utilizate analize de legare bazate pe alte mecanisme; de exemplu, analize de legare care detectează modificări ale energiei libere. Analizele de legare pot fi efectuate cu ținta fixată pe godeu, perle sau cipuri sau captate de un anticorp imobilizat sau separată prin electroforeză capilară. Compușii legați pot fi detectați, de obicei, utilizând puncte finale colorimetrice sau fluorescența sau rezonanța plasmonică de suprafață.

9. Utilizări terapeutice

În parte, prezenta dezvoltare se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea hipertensiunii pulmonare (de exemplu, hipertensiunea arterială pulmonară) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al unuia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad). În unele cazuri, dezvoltarea are în vedere compoziții pentru tratarea uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare (de exemplu, proliferarea mușchilor netezi și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară, angiogeneza în artera pulmonară, dispneea, durerea toracică, remodelarea vasculară pulmonară, hipertrofia ventriculară dreaptă și fibroză pulmonară) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. În unele cazuri, dezvoltarea are în vedere compoziții pentru utilizarea la prevenirea uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. În unele cazuri, dezvoltarea are în vedere compoziții pentru utilizarea la reducerea vitezei de progresare a hipertensiunii pulmonare cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. În unele cazuri, dezvoltarea are în vedere compoziții pentru utilizarea la reducerea vitezei de

progresare a uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. În unele cazuri, dezvoltarea are în vedere compoziții pentru utilizarea la reducerea severității hipertensiunii pulmonare cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. În unele cazuri, dezvoltarea are în vedere compoziții pentru utilizarea la reducerea severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. Opțional, metodele dezvoltate aici pentru tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității hipertensiunii pulmonare, în special tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare, pot cuprinde în plus administrarea la pacient a uneia sau mai multor terapii de susținere sau agenți activi suplimentari pentru tratarea hipertensiunii pulmonare. De exemplu, pacientului i se poate administra, de asemenea, una sau mai multe terapii de susținere sau agenți activi selectați din grupul constând din: prostaciclina și derivați ai acesteia (de exemplu, epoprostenol, treprostinil și iloprost); agoniști ai receptorilor de prostaciclina (de exemplu, selexipag); antagoniști ai receptorilor de endotelina (de exemplu, thelin, ambrisentan, macitentan și bosentan); blocante ale canalelor de calciu (de exemplu, amlodipină, diltiazem și nifedipină); anticoagulante (de exemplu, warfarină); diuretice; oxigenoterapie; septostomie atrială; tromboendarterectomie pulmonară; inhibitori de tip fosfodiesterază 5 (de exemplu, sildenafil și tadalafil); activatori de guanilat ciclază solubilă (de exemplu, cinaciguat și riociguat); inhibitori de ASK-1 (de exemplu, CIIA; SCH79797; GS-4997; MSC2032964A; 3H-nafto[1,2,3-de]chinilin-2,7-dionă, NQDI-1; 2-tioxi-tiazolidină, 5-bromo-3-(4-oxo-2-tioxi-tiazolidin-5-iliden)-1,3-dihidro-indol-2-onă); antagoniști de NF-κB (de exemplu, dh404, CDDO-epoxid; 2,2-difluoropropionamidă; imidazol C28 (CDDO-Im); acid 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic (CDDO); Acid 3-Acetiloleanolic; Acid 3-Trifluoroacetiloleanolic; 28-Metil-3-acetiloleanan; 28-Metil-3-trifluoroacetiloleanan; Acid 28-Metiloxioleanolic; SZC014; SZC015; SZC017; derivați PEGilați ai acidului oleanolic; acid 3-O-(beta-D-glucopiranozil) oleanolic; acid 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1→3)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; acid 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1→2)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; ester 28-O-beta-D-glucopiranozilic al acidului 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1→3)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; ester 28-O-beta-D-glucopiranozilic al acidului 3-O-[beta-D-glucopiranozil-(1→2)-beta-D-glucopiranozil] oleanolic; acid 3-O-[alpha-L-ramnopiranozil-(1→3)-beta-D-glucuronopiranozil] oleanolic; ester 28-O-beta-D-glucopiranozilic al acidului 3-O-[alfa-L-ramnopiranozil-(1→3)-beta-D-glucuronopiranozil] oleanolic; acid 28-O-(3-D-glucopiranozil-oleanolic; acid 3-O-β-D-glucopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranosiduronic (CS1); acid oleanolic acid 3-O-β-D-glucopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranoziluronic (CS2); 3,11-dioxolean-12-en-28-olat de metil (DIOXOL); ZCVI₄₋₂; Benzil 3-dehidr-oxi-1,2,5-oxadiazolo[3',4':2,3]oleanolat) transplant pulmonar și/sau cardiac. În unele cazuri, pacientului i se poate administra, de asemenea, o polipeptidă BMP9. În unele cazuri, polipeptida BMP9 este o polipeptidă BMP9 matură. În unele cazuri, polipeptida BMP9 cuprinde o polipeptidă prodomain BMP9. În unele cazuri, polipeptida BMP9 este administrată într-un preparat farmaceutic, care opțional poate cuprinde o polipeptidă prodomain BMP9. În astfel de preparate farmaceutice BMP9 care cuprind o polipeptidă prodomain BMP9, polipeptida BMP9 poate fi asociată necovalent cu polipeptida prodomain BMP9. În unele cazuri, preparatele farmaceutice BMP9 sunt substanțial libere sau nu conțin, din polipeptida prodomain BMP9. Polipeptidele BMP9 (mature și pro-polipeptide), polipeptidele

prodomain BMP9, compozițiile farmaceutice care le conțin precum și metoda de generare a acestor polipeptide și compoziții farmaceutice sunt descrise în, de exemplu, WO 2013/152213. Așa cum se utilizează aici, un tratament terapeutic care "previne" o tulburare sau afecțiune se referă la un compus care, într-un eșantion statistic, reduce apariția tulburării sau afecțiunii în eșantionul tratat față de un eșantion martor netratat, sau întârzie debutul sau reduce severitatea unuia sau mai multor simptome ale tulburării sau stării în raport cu proba martor netratată.

În unele cazuri, prezenta dezvoltare se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea unei boli pulmonare interstițiale (de exemplu, fibroză pulmonară idiopatică) care cuprinde administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de oricare dintre antagoniștii de GDF/BMP dezvoltate aici (de exemplu un antagonist al unuia sau mai multor activine, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad). În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este fibroza pulmonară. În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este cauzată de oricare dintre următoarele: silicoză, azbestoză, berilioză, pneumonită de hipersensibilitate, consum de medicamente (de exemplu, antibiotice, medicamente chimioterapeutice, agenți antiaritmici, statine), scleroză sistemică, polimiozită, dermatomiozită, lupus sistemic eritematos, artrită reumatoidă, o infecție (de exemplu, pneumonie atipică, pneumonie pneumochistică, tuberculoză, chlamydia trachomatis și/sau virus sincițial respirator), carcinomatoză limfangitică, fumatul de țigări sau tulburări de dezvoltare. În unele cazuri, boala pulmonară interstițială este idiopatică (de exemplu, sarcoidoză, fibroză pulmonară idiopatică, sindrom Hamman-Rich și/sau sindrom antisintetazic). În cazuri particulare, boala pulmonară interstițială este fibroza pulmonară idiopatică. În unele cazuri, tratamentul pentru fibroza idiopatică pulmonară este administrat în combinație cu un agent terapeutic suplimentar. În unele cazuri, agentul terapeutic suplimentar este selectat din grupul format din: pirfenidonă, N-acetilcisteină, prednison, azatioprină, nintedanib, derivați ai acestora și combinații ale acestora.

Termenul "tratare" așa cum se utilizează aici include ameliorarea sau eliminarea afecțiunii odată ce a fost stabilită. În ambele cazuri, prevenirea sau tratamentul pot fi discernute în diagnosticul furnizat de un medic sau de un alt furnizor de asistență medicală și rezultatul intenționat al administrării agentului terapeutic.

În general, tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni, așa cum este descris în prezenta dezvoltare, se realizează prin administrarea unui antagonist de GDF/BMP într-o cantitate eficientă. O cantitate eficientă de agent se referă la o cantitate eficientă, la doze și pentru perioade de timp necesare, pentru a se obține rezultatul terapeutic sau profilactic dorit. O cantitate eficientă terapeutică dintr-un agent conform prezentei dezvoltări poate varia în funcție de factori precum stadiul bolii, vârsta, genul și greutatea individului și capacitatea agentului de a obține un răspuns dorit la individ. O cantitate eficientă din punct de vedere profilactic se referă la o cantitate eficientă, la dozaje și pentru perioadele de timp necesare, pentru a se obține rezultatul profilactic dorit.

Termenii "subiect", "individ" sau "pacient" sunt interschimbabili în întreaga descriere și se referă în general la mamifere. Mamiferele includ, dar nu se limitează la acestea, animale domestice (de exemplu, vaci, oi, pisici, câini și cai), primate (de exemplu, oameni și primate neumane, cum ar fi maimuțele), iepuri și rozătoare (de exemplu, șoareci și șobolani).

Hipertensiunea pulmonară (PH) a fost clasificată anterior ca primară (idiopatică) sau secundară. Recent, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a clasificat hipertensiunea pulmonară în cinci grupe: Grupa 1: hipertensiune arterială pulmonară

(PAH); Grupa 2: hipertensiune pulmonară cu boală cardiacă stângă; Grupa 3: hipertensiune pulmonară cu boli pulmonare și/sau hipoxemie; Grupa 4: hipertensiune pulmonară datorată bolii cronice trombotice și/sau embolice; și Grupa 5: afecțiuni diverse (de exemplu, sarcoidoză, histiocitoză X, limfangiomatoză și comprimarea vaselor pulmonare). Vezi, de exemplu, Rubin (2004) Chest 126: 7-10.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității hipertensiunii pulmonare (de exemplu, tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al uneia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad). În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu hipertensiune pulmonară care au hipertensiune arterială pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu hipertensiune pulmonară care au hipertensiune pulmonară cu boală cardiacă stângă. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu hipertensiune pulmonară care au boli pulmonare și/sau hipoxemie. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu hipertensiune pulmonară care au boli cronice trombotice și/sau embolice. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu hipertensiune pulmonară care au sarcoidoză, histiocitoză X sau limfangiomatoză și compresie a vaselor pulmonare.

Hiperpresiunea arterială pulmonară este o boală gravă, progresivă a vasculaturii pulmonare și care pune viața în pericol, caracterizată prin vasoconstricție profundă și o proliferare anormală a celulelor musculare netede în pereții arterelor pulmonare. Constricția severă a vaselor de sânge din plămâni duce la presiuni arteriale pulmonare foarte mari. Aceste presiuni ridicate fac ca pomparea sângelui prin plămâni pentru oxigenarea lor, să fie dificilă pentru inimă. Pacienții cu PAH suferă de dificultăți de respirație extreme, pe măsură ce inima se străduiește să pompeze împotriva acestor presiuni ridicate. Pacienții cu PAH dezvoltă de obicei creșteri semnificative ale rezistenței vasculare pulmonare (PVR) și creșteri susținute ale presiunii arteriale pulmonare (PAP), care duc în cele din urmă la insuficiență ventriculară dreaptă și la deces. Pacienții diagnosticați cu PAH au un prognostic slab și o calitate a vieții la fel de compromisă, cu o speranță medie de viață de 2 până la 5 ani de la momentul diagnosticului, dacă nu sunt tratați.

O varietate de factori contribuie la patogeneza hipertensiunii pulmonare, incluzând proliferarea celulelor pulmonare, care pot contribui la remodelarea vasculară (adică, hiperplazia). De exemplu, remodelarea vasculară pulmonară are loc în primul rând prin proliferarea celulelor endoteliale arteriale și a celulelor musculare netede ale pacienților cu hipertensiune pulmonară. Se consideră că supraexprimarea diferitelor citokine promovează hipertensiunea pulmonară. Mai mult, s-a constatat că hipertensiunea pulmonară poate crește prin hiperproliferarea celulelor netede arteriale pulmonare și a celulelor endoteliale pulmonare. Mai mult, PAH-ul avansat poate fi caracterizat prin muscularizarea arteriolelor pulmonare distale, îngroșarea concentrică intimă și obstrucția lumenului vascular prin proliferarea celulelor endoteliale. Pietra și colab., J. Am. Coll. Cardiol., 43:255-325 (2004).

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității hipertensiunii pulmonare (de exemplu, tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei

cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al unuia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad), în care pacientul are presiune arterială pulmonară în repaus (PAP) cel puțin de 25 mm Hg (de exemplu, 25, 30, 35, 40, 45 sau 50 mm Hg). În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu un PAP în repaus cel puțin de 25 mm Hg. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu un PAP în repaus cel puțin de 30 mm Hg. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu un PAP în repaus cel puțin de 35 mm Hg. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu un PAP în repaus cel puțin de 40 mm Hg. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu un PAP în repaus cel puțin de 45 mm Hg. În unele cazuri, metoda se referă la pacienții cu un PAP în repaus cel puțin de 50 mm Hg.

În unele cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea la ajustarea unuia sau mai multor parametri hemodinamici ai unui pacient cu PH la un nivel mai normal (de exemplu, normal în comparație cu persoanele sănătoase de vârstă și gen similar), cuprinzând administrarea unui pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al unuia sau mai multora dintre activine, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad). În unele cazuri, metoda se referă la reducerea PAP. În unele cazuri, metoda se referă la reducerea PAP unui pacient cu cel puțin 3 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 5 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 7 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 10 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 12 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 15 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 20 mmHg. În anumite cazuri, metoda se referă la reducerea PAP a unui pacient cu cel puțin 25 mmHg. În unele cazuri, metoda se referă la reducerea rezistenței vasculare pulmonare (PVR). În unele cazuri, metoda se referă la creșterea presiunii capilare pulmonare (PCWP). În unele cazuri, metoda se referă la creșterea presiunii finale-diastolice a ventriculului stâng (LVEDP).

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare, care constă în administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP. (de exemplu, un antagonist al uneia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad). În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității proliferării celulare în artera pulmonară a unui pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității proliferării mușchiului neted și/sau a celulelor endoteliale în artera pulmonară a unui pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității angiogenezei în artera pulmonară a unui pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea activității fizice a unui pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității dispneei la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității durerii toracice la un pacient cu hipertensiune

pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității oboselii la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității fibrozei pulmonare la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității fibrozei la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității remodelării vasculare pulmonare la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității hipertrofiei ventriculare drepte la un pacient cu hipertensiune pulmonară.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în creșterea capacității de exercițiu la un pacient cu hipertensiune pulmonară care cuprinde administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al unuia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad). Poate fi utilizată orice măsură adecvată a capacității de exercițiu. De exemplu, capacitatea de exercițiu într-un test de mers timp de 6 minute (6MWT), care măsoară cât de mult poate merge subiectul în 6 minute, adică distanța de mers timp de 6 minute (6MWD), este frecvent utilizată pentru a se evalua severitatea hipertensiunii pulmonare și progresarea bolii. Indicele de dispnee Borg (BDI) este o scară numerică pentru evaluarea dispneei percepute (disconfort respirator). Măsoară gradul de respirație, de exemplu, după finalizarea 6MWT, unde un BDI de 0 indică lipsa de respirație și 10 indică respirația maximă. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 10 metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 20 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 30 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 40 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 50 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 60 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 70 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 80 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 90 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la creșterea 6MWD cu cel puțin 100 de metri la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 0,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 1 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 1,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 2 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 2,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 3 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 3,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 4 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune

pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 4,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 5,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 6 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 6,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 7 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 7,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 8 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 8,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 9 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 9,5 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu cel puțin 3 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară. În unele cazuri, metoda se referă la scăderea BDI cu 10 puncte de indice la un pacient cu hipertensiune pulmonară.

Hipertensiunea pulmonară la momentul inițial poate fi ușoară, moderată sau severă, măsurată de exemplu prin clasa funcțională conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), care este o măsură a severității bolii la pacienții cu hipertensiune pulmonară. Clasificarea funcțională a OMS este o adaptare a sistemului New York Heart Association (NYHA) și este utilizată în mod obișnuit pentru a se evalua calitativ toleranța la activitate, de exemplu în monitorizarea progresării bolii și a răspunsului la tratament (Rubin (2004) Chest 126: 7-10). În sistemul OMS sunt recunoscute patru clase funcționale: Clasa I: hipertensiune pulmonară fără a rezulta limitarea activității fizice; activitatea fizică obișnuită nu provoacă dispnee sau oboseală nejustificate, dureri toracice sau aproape sincopă; Clasa II: hipertensiune pulmonară care are ca rezultat o ușoară limitare a activității fizice; pacientul se simte confortabil în repaus; activitatea fizică obișnuită provoacă dispnee sau oboseală nejustificate, dureri toracice sau aproape sincopă; Clasa III: hipertensiune pulmonară care are ca rezultat o limitare marcată a activității fizice; pacientul se simte confortabil în repaus; mai puțin decât activitatea obișnuită provoacă dispnee sau oboseală nejustificate, dureri toracice sau aproape sincopă; Clasa IV: hipertensiune pulmonară care duce la incapacitatea de a desfășura orice activitate fizică fără simptome; pacientul manifestă semne de insuficiență cardiacă dreaptă; dispneea și/sau oboseala pot fi prezente chiar și în repaus; disconfortul este crescut de orice activitate fizică.

În anumite cazuri, dezvoltarea se referă la compoziții pentru utilizarea în tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității hipertensiunii pulmonare (de exemplu, tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiune pulmonară) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al unuia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 și una sau mai multe proteine Smad), în care pacientul are hipertensiune pulmonară din clasa I, clasa II, clasa III sau clasa IV, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la un pacient care are hipertensiune pulmonară de clasa I, așa cum este recunoscută de OMS. În unele

cazuri, metoda se referă la un pacient care are hipertensiune pulmonară de clasa II, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la prevenirea sau întârzierea progresării la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa I la hipertensiunea pulmonară de clasa II, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la promovarea sau creșterea regresiei la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa II la hipertensiunea pulmonară de clasa I, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la un pacient care are hipertensiune pulmonară de clasa a III-a, recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la prevenirea sau întârzierea progresării la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa II la hipertensiunea pulmonară de clasa a III-a, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la promovarea sau creșterea regresiei la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa III la hipertensiunea pulmonară de clasa a II-a, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la promovarea sau creșterea regresiei la pacienți de la hipertensiunea pulmonară de clasa III la hipertensiunea pulmonară de clasa I, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la un pacient care are hipertensiune pulmonară de clasa IV, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la prevenirea sau întârzierea progresării la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa III la hipertensiunea pulmonară de clasa a IV-a, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la promovarea sau creșterea regresiei la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa IV la hipertensiunea pulmonară de clasa a III-a, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la promovarea sau creșterea regresiei la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa IV la hipertensiunea pulmonară de clasa II, așa cum este recunoscută de OMS. În unele cazuri, metoda se referă la promovarea sau creșterea regresiei la un pacient de la hipertensiunea pulmonară de clasa IV la hipertensiunea pulmonară de clasa I, așa cum este recunoscută de OMS.

Nu există un tratament cunoscut pentru hipertensiunea pulmonară; metodele actuale de tratament se concentrează pe prelungirea duratei de viață a unui pacient și îmbunătățirea calității vieții pacientului. Metodele actuale de tratament ale hipertensiunii pulmonare includ administrarea de: vasodilatatoare, cum ar fi prostaciclina, epoprostenol și sildenafil; antagoniști ai receptorilor de endotelină, cum ar fi bosentan; blocante ale canalelor de calciu cum ar fi amlodipină, diltiazem și nifedipină; anticoagulante cum ar fi warfarină; și diuretice. Tratamentul hipertensiunii pulmonare a fost, de asemenea, efectuat utilizând oxigenoterapie, septostomie atrială, tromboendarterectomie pulmonară și transplant pulmonar și/sau cardiac. Fiecare dintre aceste metode, cu toate acestea, suferă de unul sau mai multe dezavantaje, care pot include lipsa de eficacitate, efecte secundare grave, acceptarea scăzută de către pacient și costuri ridicate. În anumite cazuri, metoda se referă la tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității hipertensiunii pulmonare (de exemplu, tratarea, prevenirea sau reducerea vitezei de progresare și/sau a severității uneia sau mai multor complicații ale hipertensiunii pulmonare) cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de acesta a unei cantități eficiente dintr-un antagonist de GDF/BMP (de exemplu, un antagonist al unuia sau mai multora dintre activină, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP15, BMP10, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, și una sau mai multe proteine Smad) în combinație (de exemplu, administrate în același timp sau în momente diferite, dar, în general, în așa fel încât să se obțină efecte farmacologice/fiziologice suprapuse) cu unul sau mai mulți agenți activi suplimentari și/sau terapii de susținere pentru tratarea hipertensiunii pulmonare (de exemplu, vasodilatatoare cum ar fi prostaciclina, epoprostenol și

sildenafil; antagoniști ai receptorilor endotelinei cum ar fi bosentan; blocați ai canalelor de calciu cum ar fi amlodipină, diltiazem și nifedipină; anticoagulanți cum ar fi warfarină; diuretice; oxigenoterapie; septostomie atrială; tromboendarterectomie pulmonară: și transplant pulmonar și/sau cardiac); polipeptide BMP9; polipeptide BMP 10; bardoxolon metil sau un derivat al acestuia; acid oleanolic sau un derivat al acestuia.

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare redă metode de gestionare a unui pacient care a fost tratat cu sau este un candidat să fie tratat cu unul sau mai mulți unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP conform dezvoltării (de exemplu, capcane pentru liganzi cum ar fi polipeptide ActRIIA, polipeptide ActRIIB și polipeptide GDF Trap) prin măsurarea unuia sau mai multor parametri hematologici ai pacientului. Parametrii hematologici pot fi utilizați pentru a se evalua dozarea adecvată pentru un pacient care este candidat să fie tratat cu antagonistul conform prezentei dezvoltării, pentru a se monitoriza parametrii hematologici în timpul tratamentului, pentru a se evalua dacă se ajustează doza în timpul tratamentului cu unul sau mai mulți antagoniști conform dezvoltării și/sau pentru a se evalua o doză adecvată de întreținere a unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării. Dacă unul sau mai mulți parametri hematologici sunt în afara nivelului normal, dozarea cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP poate fi redusă, întârziată sau terminată.

Parametrii hematologici care pot fi măsurați în conformitate cu metodele redate aici includ, de exemplu, nivelurile de celule roșii din sânge, presiunea sanguină, depozitele de fier și alți agenți găsiți în fluidele corporale care se corelează cu niveluri crescute de celule roșii din sânge, utilizând metode recunoscute în domeniu. Astfel de parametri pot fi determinați folosind o probă de sânge de la un pacient. Creșterile nivelurilor de globule roșii, nivelurilor de hemoglobină și/sau nivelurilor de hematocrit pot determina creșterea presiunii sanguine.

Într-un caz, dacă unul sau mai mulți parametri hematologici sunt în afara intervalului normal sau în partea superioară a normalului la un pacient care este candidat la tratamentul cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP, atunci debutul administrării unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării poate fi întârziat până când parametrii hematologici au revenit la un nivel normal sau acceptabil fie natural, fie prin intervenție terapeutică. De exemplu, dacă un pacient candidat este hipertensiv sau pre-hipertensiv, atunci pacientul poate fi tratat cu un agent de scădere a presiunii sanguine pentru a reduce presiunea sanguină a pacientului. Poate fi utilizat orice agent de scădere a presiunii sanguine adecvat pentru starea pacientului, inclusiv, de exemplu, diuretice, inhibitori adrenergici (inclusiv alfa-blocați și beta-blocați), vasodilatatori, blocați ai canalelor de calciu, inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei (ACE) sau blocante ale receptorilor de angiotensină II. Presiunea sanguină poate fi tratată alternativ folosind o dietă și un regim de exerciții fizice. Similar, dacă un pacient candidat are depozite de fier mai mici decât în mod normal sau în partea inferioară a normalului, atunci pacientul poate fi tratat cu un regim adecvat de dietă și/sau suplimente de fier până când depozitele de fier ale pacientului au revenit la un nivel normal sau un nivel acceptabil. Pentru pacienții cu niveluri mai ridicate decât celulele roșii din sânge și/sau niveluri de hemoglobină, atunci administrarea unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării poate fi întârziată până când nivelurile au revenit la un nivel normal sau acceptabil.

În anumite cazuri, dacă unul sau mai mulți parametri hematologici sunt în afara intervalului normal sau în partea superioară a normalului la un pacient care este candidat la tratament cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP, atunci debutul administrării nu poate fi întârziat. Cu toate acestea, cantitatea de dozare sau frecvența

de dozare a unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării pot fi stabilite la o cantitate care ar reduce riscul unei creșteri inacceptabile a parametrilor hematologici care apar la administrarea unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării. Alternativ, pentru pacient poate fi dezvoltat un regim terapeutic care combină unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP cu un agent terapeutic care abordează nivelul nedorit al parametrului hematologic. De exemplu, dacă pacientul are presiunea sanguină crescută, atunci poate fi conceput un regim terapeutic care implică administrarea unuia sau mai multor agenți antagoniști de GDF/BMP și a unui agent de scădere a presiunii sanguine. Pentru un pacient care are depozite de fier mai mici decât cele dorite, poate fi dezvoltat un regim terapeutic care implică unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP conform dezvoltării și suplimentarea cu fier.

Într-un caz, parametrul(ii) inițiali pentru unul sau mai mulți parametri hematologici pot fi stabiliți pentru un pacient care este candidat la tratament cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP ai dezvoltării și un regim de dozare adecvat stabilit pentru acel pacient pe baza valorii(lor) inițiale. Alternativ, parametrii inițiali stabiliți pe baza istoricului medical al unui pacient ar putea fi utilizați ca informare pentru un regim de dozare adecvat cu antagonist la un pacient. De exemplu, dacă un pacient sănătos are stabilită o presiune sanguină inițială stabilită care depășește intervalul normal definit, este posibil să nu fie necesar să se aducă presiunea sanguină a unui pacient în intervalul considerat normal pentru populația generală înainte de tratamentul cu mai antagonist conform dezvoltării. Valorile inițiale ale unui pacient pentru unul sau mai mulți parametri hematologici înainte de tratamentul cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP conform dezvoltării pot fi, de asemenea, folosite ca valori comparative relevante pentru monitorizarea oricăror modificări ale parametrilor hematologici în timpul tratamentului cu unul sau mai mulți antagoniști conform dezvoltării.

În anumite cazuri, unul sau mai mulți parametri hematologici sunt măsurați la pacienții care sunt tratați cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP. Parametrii hematologici pot fi utilizați pentru a se monitoriza pacientul în timpul tratamentului și a permite ajustarea sau încetarea dozării cu unul sau mai mulți antagoniști conform dezvoltării sau dozarea suplimentară cu un alt agent terapeutic. De exemplu, dacă administrarea unuia sau mai multor antagoniști de GDF/BMP are ca rezultat o creștere a presiunii sanguine, a nivelului de celule roșii din sânge sau a nivelului de hemoglobină sau o reducere a depozitelor de fier, atunci doza unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării pot să fie reduse în cantitate sau ca frecvență pentru a reduce efectele unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării asupra unuia sau mai multor parametri hematologici. Dacă administrarea unuia sau mai multor antagoniști de GDF/BMP are ca rezultat o modificare a unuia sau mai multor parametri hematologici care este adversă pentru pacient, atunci dozarea unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării poate fi terminată fie temporar, până când parametrul(ii) hematologic(i) revine la un nivel acceptabil sau permanent. Similar, dacă unul sau mai mulți parametri hematologici nu sunt aduși într-un interval acceptabil după reducerea dozei sau a frecvenței de administrare a unuia sau mai multor antagoniști conform dezvoltării, atunci dozarea poate fi terminată. Ca alternativă sau, în plus față de reducerea sau terminarea dozării cu unul sau mai mulți antagoniști conform dezvoltării, pacientul poate fi dozat cu un agent terapeutic suplimentar care se adresează nivelului nedorit al parametrilor hematologici, cum ar fi, de exemplu, un agent de scădere a presiunii sanguine sau un supliment de fier. De exemplu, dacă un pacient care este tratat cu unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP are presiunea sanguină, atunci dozarea cu unul sau mai mulți antagoniști conform dezvoltării poate continua la același

nivel și la regimul de tratament este adăugat un agent de scădere a presiunii sanguine, dozarea cu unul sau mai mulți antagoniști conform dezvoltării poate fi redusă (*de exemplu*, în cantitate și/sau ca frecvență) și un agent de scădere a presiunii sanguine este adăugat regimului de tratament, sau dozarea cu unul sau mai mulți antagoniști ai dezvoltării poate fi întreruptă și pacientul poate fi tratat cu un agent de scădere a presiunii sanguine.

10. Compoziții farmaceutice

Agenții terapeutici descriși aici (de exemplu, antagoniști de GDF/BMP) pot fi formulați în compoziții farmaceutice. Compozițiile farmaceutice pentru utilizarea în conformitate cu prezenta descriere pot fi formulate convențional utilizând unul sau mai mulți purtători sau excipienți acceptabili fiziologic. Astfel de formulări vor fi în general substanțial lipsite de pirogeni, în conformitate cu majoritatea cerințelor de reglementare.

În anumite cazuri, metodele terapeutice ale dezvoltării includ administrarea sistemică sau locală ca implant sau dispozitiv a compoziției. Când este administrată, compoziția terapeutică pentru utilizarea în această dezvoltare este într-o formă acceptabilă fiziologic, substanțial liberă de pirogen sau liberă de pirogen. Agenții utili terapeutic, alții decât antagoniștii de GDF/BMP, care pot fi, de asemenea, incluși opțional în compoziția descrisă mai sus, pot fi administrați simultan sau secvențial cu compușii în cauză în metodele dezvoltate aici.

Tipic, agenții terapeutici proteici dezvoltăți aici vor fi administrați parental, în special intravenos sau subcutanat. Compozițiile farmaceutice adecvate pentru administrare parenterală pot cuprinde unul sau mai mulți antagoniști de GDF/BMP în combinație cu una sau mai multe soluții apoase sau neapoase izotonice sterile acceptabile farmaceutic, dispersii, suspensii sau emulsii, sau pulberi sterile care pot fi reconstituite în soluții sterile injectabile sau dispersii exact înainte de utilizare, care poate conține antioxidanți, tamponi, bacteriostatice, substanțe dizolvate care fac formularea izotonică cu sângele destinatarului intenționat sau agenți de suspendare sau îngroșare. Exemple de purtători apoși și neapoși care pot fi utilizați în compozițiile farmaceutice din dezvoltare includ apă, etanol, polioli (cum ar fi glicerol, propilen glicol, polietilen glicol și altele asemenea) și amestecuri adecvate ale acestora, uleiuri vegetale, cum ar fi ulei de măsline și esteri organici injectabili, cum ar fi oleat de etil. Fluiditatea adecvată poate fi menținută, de exemplu, prin utilizarea de materiale de acoperire, cum ar fi lecitina, prin menținerea dimensiunii necesare a particulelor în cazul dispersiilor și prin utilizarea agenților tensioactivi.

Compozițiile și formulările pot fi, dacă se dorește, prezentate într-un ambalaj sau dispozitiv de dozare care poate conține una sau mai multe forme de dozare unitare care conțin ingredientul activ. Ambalajul poate cuprinde, de exemplu, folie de metal sau plastic, cum ar fi un blister. Pachetul sau dispozitivul dozator pot fi însoțite de instrucțiuni de administrare.

Mai mult, compoziția poate fi încapsulată sau injectată într-o formă pentru livrarea către un situs al unui țesut țintă. În anumite cazuri, compozițiile conform prezentei dezvoltări pot include o matrice capabilă să livreze unul sau mai mulți compuși terapeutici (de exemplu, antagoniști de GDF/BMP) către un situs al unui țesut țintă, oferind o structură pentru țesutul în curs de dezvoltare și capabil să fie resorbit optim în corp. De exemplu, matricea poate asigura eliberarea lentă a antagonistului de GDF/BMP. Astfel de matrice pot fi formate din materiale utilizate în prezent pentru alte aplicații medicale implantate.

Alegerea materialului matricei se bazează pe biocompatibilitate, biodegradabilitate, proprietăți mecanice, aspect cosmetic și proprietăți de interfață.

Aplicarea particulară a compozițiilor în cauză va defini formularea adecvată. Potențialele matrice pentru compoziții pot fi biodegradabile și sulfat de calciu, fosfat tricalcic, hidroxiapatit, acid polilactic și polianhidride definit chimic. Alte potențiale materiale sunt biodegradabile și bine definite biologic, cum ar fi colagenul osos sau dermic. Alte matrice cuprind proteine pure sau componente ale matricei extracelulare. Alte potențiale matrice sunt non-biodegradabile și definite chimic, cum ar fi hidroxiapatita sinterizată, biosticlă, aluminați sau alte ceramice. Matricele pot fi compuse din combinații ale oricăruia dintre tipurile de materiale menționate mai sus, cum ar fi acidul polilactic și hidroxiapatita sau colagenul și fosfatul tricalcic. Bioceramicele pot fi modificate în compoziție, cum ar fi în calciu-aluminat-fosfat și prelucrate pentru a se modifica dimensiunea porilor, dimensiunea particulelor, forma particulelor și biodegradabilitatea.

În anumite cazuri, compozițiile pentru utilizarea conform dezvoltării pot fi administrate pe cale orală, de exemplu, sub formă de capsule, cașete, pilule, tablete, pastile (folosind o bază aromată, de obicei zaharoză și acacia sau tragacant), pulberi, granule, sau ca o soluție sau o suspensie într-un lichid apos sau neapos, sau ca o emulsie lichidă ulei-în-apă sau apă-în-ulei, sau ca elixir sau sirop sau ca pastile (folosind o bază inertă, cum ar fi ca gelatina și glicerina, sau zaharoza și acacia) și/sau ca spălături de gură și altele asemenea, fiecare conținând o cantitate predeterminată de agent ca ingredient activ. Un agent poate fi administrat, de asemenea, sub formă de bolus, electuar sau pastă.

În forme de dozare solide pentru administrare orală (capsule, tablete, pilule, drajeuri, pulberi, granule și altele asemenea), unul sau mai mulți compuși terapeutici din prezenta descriere pot fi amestecați cu unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic, cum ar fi citratul de sodiu sau fosfatul dicalcic și/sau oricare dintre următoarele: (1) materiale de umplutură sau diluanți, cum ar fi amidonuri, lactoză, zaharoză, glucoză, manitol și/sau acid silicic; (2) lianți, cum ar fi, de exemplu, carboximetilceluloză, algi-nați, gelatină, polivinil pirolidonă, zaharoză și/sau acacia; (3) umectanți, cum ar fi glicerină; (4) agenți de dezintegrare, cum ar fi agar-agar, carbonat de calciu, amidon din cartof sau tapioca, acid alginic, anumiți silicați și carbonat de sodiu; (5) agenți de întârziere a soluției, cum ar fi parafina; (6) acceleratori de absorbție, cum ar fi compuși de amoniu cuaternari; (7) agenți de umectare, cum ar fi, de exemplu, alcool cetilic și monostearat de glicerol; (8) absorbantți, cum ar fi caolin și argilă bentonitică; (9) lubrifianți, cum ar fi talc, stearat de calciu, stearat de magneziu, polietilen glicoli solizi, laurilsulfat de sodiu și amestecuri ale acestora; și (10) agenți de colorare. În cazul capsulelor, tabletelor și pilulelor, compozițiile farmaceutice pot cuprinde, de asemenea, agenți de tamponare. Compoziții solide de un tip similar pot fi, de asemenea, utilizate ca umpluturi în capsule gelatinoase moi și tari umplute, utilizând excipienți cum ar fi lactoză sau zaharuri din lapte, precum și polietilen glicoli cu greutate moleculară mare și altele asemenea.

Formele de dozare lichide pentru administrarea orală includ emulsii acceptabile farmaceutic, microemulsii, soluții, suspensii, siropuri și elixiruri. În plus față de ingredientul activ, formele de dozare lichide pot conține diluanți inerti utilizați de regulă în domeniu, cum ar fi apa sau alți solvenți, agenți de solubilizare și emulgatori, cum ar fi alcool etilic, alcool izopropilic, carbonat de etil, acetat de etil, alcool benzilic benzoat de benzii, propilen glicol, 1,3-butilen glicol, uleiuri (în special uleiuri din semințe de bumbac, arahide, porumb, germeți, măsline, ricin și susan), glicerol, alcool tetrahidrofurilic, polietilen glicoli și esteri ai acizilor grași ai sorbitanului și amestecuri ale acestora. În afară de diluanți inerti, compozițiile orale pot include, de asemenea,

adjuvanți, cum ar fi agenți de umectare, agenți de emulsionare și suspendare, îndulcitori, aromatizanti, coloranți, parfumați și agenți de conservare.

Suspensiile, pe lângă compușii activi, pot conține agenți de suspendare, cum ar fi alcoolii izostearilici etoxilați, polioxietilen sorbitol și esteri de sorbitan, celuloză microcristalină, metahidroxid de aluminiu, bentonită, agar-agar și tragacant și amestecuri ale acestora.

Compozițiile conform dezvoltării pot conține, de asemenea, adjuvanți, cum ar fi conservanți, agenți de umectare, agenți de emulsionare și agenți de dispersare. Prevenirea acțiunii microorganismelor poate fi asigurată prin includerea a diferiți agenți antibacterieni și antifungici, de exemplu, paraben, clorobutanol, acid fenol sorbic și altele asemenea. De asemenea, poate fi de dorit să se includă în compoziții agenți izotonici, cum ar fi zaharurile, clorura de sodiu și altele asemenea. În plus, absorbția prelungită a formei farmaceutice injectabile poate fi realizată prin includerea agenților care întârzie absorbția, cum ar fi monostearatul de aluminiu și gelatina.

Se înțelege că regimul de dozare va fi determinat de medicul curant luând în considerare diferiți factori care modifică acțiunea compușilor care fac obiectul dezvoltării (de exemplu, antagoniști de GDF/BMP). Diverșii factori includ, dar nu sunt limitați la, vârsta, genul și dieta pacientului, severitatea bolii, timpul de administrare și alți factori clinici. Opțional, dozajul poate varia în funcție de tipul de matrice utilizat în reconstituire și de tipurile de compuși din compoziție. Adăugarea altor factori de creștere cunoscuți la compoziția finală poate afecta, de asemenea, doza. Progresul poate fi monitorizat prin evaluarea periodică a creșterii și/sau reparării osoase, de exemplu, raze X (inclusiv DEXA), determinări histomorfometrice și etichetare cu tetraciclină.

În anumite cazuri, prezenta dezvoltare redă, de asemenea, o terapie genetică pentru producția in vivo de antagoniști de GDF/BMP. O astfel de terapie și-ar putea atinge efectul terapeutic prin introducerea secvențelor polinucleotidice antagoniste GDF/BMP în celule sau țesuturi care prezintă tulburările enumerate mai sus. Livrarea de secvențe de polinucleotide antagoniste de GDF/BMP poate fi realizată utilizând un vector de exprimare recombinant, cum ar fi un virus himeric sau un sistem de dispersie coloidală. Pentru livrarea terapeutică a secvențelor de polinucleotide antagoniste de GDF/BMP este preferată utilizarea lipozomilor țintiți.

Diverși vectori virali care pot fi utilizați pentru terapia genică așa cum este învățătura de aici includ adenovirus, virusul herpes, vaccinia sau, de preferință, un virus ARN, cum ar fi un retrovirus. De preferință, vectorul retroviral este un derivat al unui retrovirus murin sau aviar. Exemple de vectori retrovirali în care se poate insera o singură genă străină includ, dar nu se limitează la: virusul leucemiei murine Moloney (MoMuLV), virusul sarcomului murin Harvey (HaMuSV), virusul tumorii mamare murine (MuMTV) și virusul Sarcomului Rous (RSV). O serie de vectori retrovirali suplimentari pot încorpora gene multiple. Toți acești vectori pot transfera sau încorpora o genă pentru un marker selectabil, astfel încât să poată fi identificate și generate celulele transduse. Vectorii retrovirali pot fi realizați specific țintei prin atașarea, de exemplu, a unui zahăr, a unei glicolipide sau a unei proteine. Țintirea preferată se realizează prin utilizarea unui anticorp. Cei de specialitate în domeniu vor recunoaște că secvențe de polinucleotide specifice pot fi inserate în genomul retroviral sau atașate la o anvelopă virală pentru a permite livrarea specifică țintită a vectorului retroviral care conține antagonistul de GDF/BMP. Într-un caz preferat, vectorul este direcționat către os sau cartilaj.

Alternativ, celulele de cultură de țesut pot fi transfectate direct cu plasmide care codifică gene structurale retrovirale gag, pol și env, prin transfecție convențională de

fosfat de calciu. Aceste celule sunt apoi transfectate cu vectorul plasmidic care conține genele de interes. Celulele rezultate eliberează vectorul retroviral în mediul de cultură.

Un alt sistem de livrare țintită pentru polinucleotide antagoniste de GDF/BMP este un sistem de dispersie coloidală. Sistemele de dispersie coloidală includ complecși de macromolecule, nanocapsule, microsferă, perle și sisteme pe bază de lipide, incluzând emulsii ulei-în-apă, micle, micle mixte și lipozomi. Sistemul coloidal preferat conform acestei dezvoltări este un lipozom. Lipozomii sunt vezicule cu membrană artificială care sunt utile ca vehicule de livrare in vitro și in vivo. ARN-ul, ADN-ul și virionii intacti pot fi încapsulați în interiorul apos și pot fi eliberați celulelor într-o formă activă biologic (vezi de exemplu, Fraley, și colab., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Metode pentru transferul eficient al genei folosind un vehicul lipozomic sunt cunoscute în domeniu, vezi, de exemplu, Mannino, și colab., Biotechniques, 6:682, 1988. Compoziția lipozomului este de obicei o combinație de fosfolipide, uzual în combinație cu steroizi, în special colesterol. Se pot utiliza și alte fosfolipide sau alte lipide. Caracteristicile fizice ale lipozomilor depind de pH-ul, tăria ionică și prezența cationilor divalenți.

Exemple de lipide utile în producția de lipozomi includ compuși fosfatidilici, cum ar fi fosfatidilglicerol, fosfatidilcolină, fosfatidilserină, fosfatidiletanolamină, sfingolipide, cerebrozide și ganglioizide. Fosfolipidele ilustrative includ fosfatidilcolină din ou, dipalmitilfosfatidilcolină și distearoilfosfatidilcolină. Țintirea lipozomilor este, de asemenea, posibilă pe baza, de exemplu, a specificității pentru organe, a specificității pentru celulă și a specificității pentru organelă și este cunoscută în domeniu.

Dezvăluirea redă formulări care pot fi variate pentru a include acizi și baze pentru ajustarea pH-ului; și agenți tampon pentru a menține pH-ul într-un interval îngust.

EXEMPLIFICARE

Dezvăluirea fiind acum descrisă în general, va fi mai ușor înțeleasă cu referire la următoarele exemple, care sunt incluse numai în scop de ilustrare a anumitor cazuri ale prezentei dezvoltări și nu sunt destinate să limiteze dezvoltarea. Exemplele 4-12 nu fac parte din prezenta invenție.

Exemplul 1: Proteine de fuziune ActRIIA-Fc

A fost construită o proteină de fuziune ActRIIA solubilă care are domeniul extracelular al ActRIIA uman fuzionat la un domeniu Fc uman sau de șoarece cu un linker minim între ele. Construcții sunt denumiți ActRIIA-hFc și, respectiv, ActRIIA-mFc.

ActRIIA-hFc este prezentat mai jos așa cum este purificat din linii de celule CHO (SEQ ID NO: 32):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEI
VKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNP
VTPKPTGGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

Proteinele ActRIIA-hFc și ActRIIA-mFc au fost exprimate în linii de celule CHO. Au fost luate în considerare trei secvențe de lider diferite:

(i) Melitină din miere de albine (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 33)

(ii) Activator de plasminogen pentru țesut (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 34)

(iii) Nativ: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 35).

Forma selectată folosește liderul TPA și are următoarea secvență de aminoacizi neprelucrată:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTG
VEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFC
CCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHCPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)

Această polipeptidă este codificată de următoarea secvență de acid nucleic:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGC
AGTCTTCGTTTCGCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGT
CTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACC
GTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATT
TCTGGTTCATTGAATAGTGAAACAAGTTGTTGGCTGGATGATATCAAACCTGCTA
TGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGC
TGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCA
CACAGCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCA
CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAACCTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 37)

Atât ActRIIA-hFc, cât și ActRIIA-mFc au fost remarcabil de maleabile la exprimarea recombinantă. Așa cum este prezentat în Figura 5, proteina a fost purificată ca un singur pic de proteină bine definit. Secvențierea N-terminală a pus în evidență o singură secvență de -ILGRSETQE (SEQ ID NO: 38). Purificarea ar putea fi realizată printr-o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu sefaroză Q, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie de excludere dimensională și cromatografie cu schimb de cationi. Purificarea ar putea fi completată cu filtrare virală și schimb de tampon. Proteina ActRIIA-hFc a fost purificată la o puritate de > 98% determinată prin cromatografie de excludere dimensională și > 95% determinată prin SDS PAGE.

ActRIIA-hFc și ActRIIA-mFc au demonstrat o afinitate mare pentru liganzi. GDF11 sau activina A au fost imobilizate pe un cip Biacore™ CM5 folosind procedura standard de cuplare a aminei. Proteinele ActRIIA-hFc și ActRIIA-mFc au fost încărcate pe sistem și legarea a fost măsurată. ActRIIA-hFc s-a legat la activină cu o constantă de disociere (K_D) de 5×10^{-12} și s-a legat de GDF11 cu o K_D de $9,96 \times 10^{-9}$. Vezi Figura 6. Folosind un test de legare similar, s-a determinat că ActRIIA-hFc are afinitate crescută până la moderată pentru alți liganzi din superfamilia de TGF-beta incluzând, de exemplu, activina B, GDF8, BMP6 și BMP10. ActRIIA-mFc s-a comportat similar.

ActRIIA-hFc a fost foarte stabil în studiile farmacocinetice. Șobolanii au fost dozați cu 1 mg/kg, 3 mg/kg sau 10 mg/kg de proteină ActRIIA-hFc, iar nivelurile plasmatice ale proteinei au fost măsurate la 24, 48, 72, 144 și 168 ore. Într-un studiu separat, șobolanii au fost dozați la 1 mg/kg, 10 mg/kg sau 30 mg/kg. La șobolani, ActRIIA-hFc a avut un timp de înjumătățire serică de 11-14 zile, iar nivelurile circulante ale medicamentului au fost destul de ridicate după două săptămâni (11 μ g/ml, 110 μ g/ml sau 304 μ g/ml pentru administrări inițiale de 1 mg/kg, 10 mg/kg sau respectiv 30 mg/kg). La maimuțele cynomolgus, timpul de înjumătățire plasmatică a fost substanțial mai mare de 14 zile, și nivelurile circulante ale medicamentului au fost de 25 μ g/ml, 304 μ g/ml sau 1440 μ g/ml pentru administrări inițiale de 1 mg/kg, 10 mg/kg, sau respectiv 30 mg/kg.

Exemplul 2: Caracterizarea unei proteine ActRIIA-hFc

Proteina de fuziune ActRIIA-hFc a fost exprimată în celule CHO-DUKX B11 transfectate stabil dintr-un vector pAID4 (SV40 ori/amplificator, promotor CMV), utilizând o secvență lider de plasminogen de țesut din SEQ ID NO: 34. Proteina, purificată așa cum este descris mai sus în Exemplul 1, a avut o secvență de SEQ ID NO: 32. Porțiunea Fc este o secvență de Fc IgG1 umană, așa cum este arat în SEQ ID NO: 32. Analiza proteinei arată că proteina de fuziune ActRIIA-hFc este formată ca un homodimer cu legătură de disulfură.

Materialul exprimat în celule CHO are o afinitate mai mare pentru ligandul activina B decât cea raportată pentru o proteină de fuziune ActRIIA-hFc exprimată în 293 celule umane [vezi, del Re și colab. (2004) J Biol Chem. 279(51):53126-53135]. În plus, utilizarea secvenței lider TPA a furnizat o producție mai mare decât alte secvențe lider și, spre deosebire de ActRIIA-Fc exprimată cu un lider nativ, a furnizat o secvență N-terminală cu puritate ridicată. Utilizarea secvenței de lider nativ a dus la două specii majore de ActRIIA-Fc, fiecare având o secvență N-terminală diferită.

Exemplul 3: Proteine ActRIIA-Fc alternative

O varietate de variante de ActRIIA care pot fi utilizate în conformitate cu metodele descrise aici sunt descrise în cererea internațională de brevet publicată ca WO2006/012627 (vezi de exemplu, pag. 55-58). Un construct alternativ poate avea o deleție a cozii C-terminale (ultimii 15 aminoacizi ai domeniului extracelular al ActRIIA). Secvența pentru un astfel de construct este prezentată mai jos (porțiunea Fc subliniată) (SEQ ID NO: 39):

ILGRSETQCECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Exemplul 4: Generarea proteinelor de fuziune ActRIIB-Fc

Solicitanții au construit o proteină de fuziune ActRIIB solubilă care are domeniul extracelular al ActRIIB uman fuzionat la un domeniu Fc uman sau de șoarece cu un linker minim între ele. Construcții sunt denumiți ActRIIB-hFc și, respectiv, ActRIIB-mFc.

ActRIIB-hFc este prezentat mai jos, purificat din liniile de celule CHO (SEQ ID NO: 40):

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Proteinele ActRIIB-hFc și ActRIIB-mFc au fost exprimate în linii de celule CHO. Au fost luate în considerare trei secvențe lider diferite: (i) Melitină din miere de albine (HBML), ii) Activator plasminogen de țesut (TPA) și (iii) Nativ: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 41).

Forma selectată folosește liderul TPA și are următoarea secvență de aminoacizi neprocesată (SEQ ID NO: 42):

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQO
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Această polipeptidă este codificată de următoarea secvență de aczi nucleici (SEQ ID NO: 43):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
 GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCA GGTGTA CTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
 ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGGAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA
 CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTCTG ACCAGGACTG
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG
 TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 AAATGA

Secvențierea N-terminală a materialului produs de celule CHO a pus în evidență o secvență majoră de -GRGEAE (SEQ ID NO: 44). Este de remarcat în special, că alți construcți raportați în literatură încep cu o secvență -SGR...

Purificarea ar putea fi realizată printr-o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu sefaroză Q, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie cu excludere dimensională și cromatografie cu schimb de cationi. Purificarea ar putea fi terminată cu o filtrare virală și schimb de tampon.

Proteinele de fuziune ActRIIB-Fc au fost, de asemenea, exprimate în celule HEK293 și celule COS. Deși materialul din toate liniile celulare și condițiile rezonabile de cultură au asigurat proteine cu activitate de construire a mușchilor *in vivo*, s-a observat variabilitatea puterii, probabil legată de selecția liniei celulare și/sau condițiile de cultură.

Solicitanții au generat o serie de mutații în domeniul extracelular al ActRIIB și au produs aceste proteine mutante ca proteine de fuziune solubile între ActRIIB extracelular și un domeniu Fc. Fuziunea ActRIIB-Fc de fundal are secvența SEQ ID NO: 40.

Diverse mutații, inclusiv trunchieri N- și C-terminale, au fost introduse în proteina ActRIIB-Fc de fundal. Pe baza datelor prezentate aici, este de așteptat ca acești construcți, dacă sunt exprimați cu un lider TPA, să nu aibă serina N-terminală. Mutațiile au fost generate în domeniul extracelular al ActRIIB prin mutagenază PCR. După PCR,

fragmentele au fost purificate printr-o coloană Qiagen, digerate cu Sfol și Agel și purificate pe gel. Aceste fragmente au fost ligate în vectorul de exprimare pAID4 (vezi WO2006/012627) astfel încât la ligare a creat o himeră de fuziune cu IgG1 uman. După transformarea în *E. coli* DH5 alfa, coloniile au fost culese și ADN-urile au fost izolate. Pentru construcții murini (mFc), o IgG2a murină a fost substituită cu IgG1 umană. Au fost verificate secvențele tuturor mutațiilor.

Toți mutații au fost produși în celule HEK293T prin transfecție tranzitorie. Pe scurt, într-un flator de 500 ml, celulele HEK293T au fost introduse la 6×10^5 celule/ml în mediu Freestyle (Invitrogen) într-un volum de 250 ml și crescute peste noapte. A doua zi, aceste celule au fost tratate cu un complex de ADN:PEI (1:1) la 0,5 ug/ml concentrație finală de ADN. După 4 ore, s-au adăugat 250 ml mediu și celulele au fost crescute timp de 7 zile. Mediul condiționat a fost recoltat prin rotirea celulelor și concentrat.

Mutații au fost purificate folosind o varietate de tehnici, incluzând, de exemplu, o coloană de proteină A și eluați cu tampon de glicină cu pH scăzut (3,0). După neutralizare, acestea au fost dializate față de PBS.

Mutații au fost, de asemenea, produși în celulele CHO printr-o metodologie similară. Mutații au fost testați în analize de legare și/sau analize biologice descrise în WO 2008/097541 și WO 2006/012627. În unele cazuri, analizele au fost efectuate cu mediu condiționat, mai degrabă decât cu proteine purificate. Variații suplimentare ale ActRIIB sunt descrise în Brevetul U.S. Nr. 7,842,663.

Solicitantul a generat o proteină de fuziune ActRIIB (25-131)-hFc, care cuprinde domeniul extracelular ActRIIB uman cu trunchieri N-terminale și C-terminale (reziduurile 25-131 ale proteinei native cu SEQ ID NO: 1) fuzionat N-terminal cu o secvență lider TPA care substituie liderul ActRIIB nativ și C-terminal cu un domeniu Fc uman printr-un linker minim (trei reziduuri de glicină) (Figura 7). O secvență de nucleotide care codifică această proteină de fuziune este prezentată în Figura 8. Solicitanții au modificat codonii și au găsit o variantă de acid nucleic care codifică proteina ActRIIB(25-131)-hFc care a furnizat îmbunătățiri substanțiale în nivelurile de exprimare ale transformanților inițiali (Figura 9).

Proteina matură are o secvență de aminoacizi după cum urmează (N-terminal confirmat prin secvențierea N-terminal) (SEQ ID NO: 45):

ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

Molecula exprimată a fost purificată utilizând o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu sefaroză Q, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie cu excludere dimensională și cromatografie cu schimb de cationi. Purificarea ar putea fi terminată cu o filtrare virală și schimb de tampon.

Afinitățile mai multor liganzi pentru ActRIIB(25-131)-hFc și omologul său cu toată lungimea ActRIIB(20-134)-hFc au fost evaluate in vitro cu un instrument Biacore™, și rezultatele sunt rezumate în tabelul de mai jos. Valorile K_d au fost obținute prin potrivirea afinității în stare staționară datorită asocierii și disocierii foarte rapide a complexului, care a împiedicat determinarea cu acuratețe a K_{on} și K_{off}.

ActRIIB(25-131)-hFc legat, de exemplu, de activina A, activina B și GDF11 cu afinitate ridicată.

Afinități de ligand ale formelor de ActRIIB-hFc:

Construct de fuziune	Activin A (e-11)	Activin B (e-11)	GDF11 (e-11)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1

Exemplul 5: Generarea unei capcane de GDF

O capcană GDF a fost construită după cum urmează. O polipeptidă având un domeniu extracelular modificat de ActRIIB (aminoacizii 20-134 din SEQ ID NO: 1 cu o substituție L79D) cu legare a activinei A redusă mult legând în raport cu GDF11 și/sau miostatina (ca o consecință a substituția leucinei la aspartat la poziția 79 din SEQ ID NO: 1) a fost fuzionată cu un domeniu Fc uman sau de șoarece cu un linker minim între ele. Construcții sunt denumiți ActRIIB(L79D 20-134)-hFc și, respectiv, ActRIIB(L79D 20-134)-mFc. Formele alternative cu un glutamat mai degrabă decât un aspartat în poziția 79 au funcționat similar (L79E). Au fost de asemenea generate forme alternative cu o alanină mai degrabă decât o valină la poziția 226 față de SEQ ID NO: 64, de mai jos, și au avut un comportament echivalent în toate privințele testate. Aspartatul din poziția 79 (față de SEQ ID NO: 1) este indicat prin sublinierea cu linie dublă de mai jos. Valina din poziția 226 față de SEQ ID NO: 64 este, de asemenea, indicată prin sublinierea cu linie dublă de mai jos.

Capcana de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc este prezentată mai jos, așa cum este purificată din liniile de celule CHO (SEQ ID NO: 46).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
 APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK
ENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PYPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

Porțiunea derivată din ActRIIB a capcanei de GDF are o secvență de aminoacizi prezentată mai jos (SEQ ID NO: 47) și acea porțiune ar putea fi utilizată ca monomer sau ca proteină de fuziune non-Fc ca monomer, dimer sau complex de ordin mai mare.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
 APT (SEQ ID NO: 47)

Proteina capcană de GDF a fost exprimată în linii de celule CHO. Au fost luate în considerare trei secvențe lider diferite:

(i) Melitina din miere de albine (HBML), (ii) Activator de plasminogen de țesut (TPA) și (iii) Nativ.

Forma selectată folosește liderul TPA și are următoarea secvență de aminoacizi neprelucrată:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHODWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 48)

Această polipeptidă este codificată de următoarea secvență de acizi nucleici (SEQ ID NO: 49):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
 GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
 ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGGAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAA
 CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGAC ACCAGGACTG
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG
 TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 AAATGA

Purificarea ar putea fi realizată printr-o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu sefaroză Q, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie cu excludere dimensională și cromatografie cu schimb de cationi. Purificarea ar putea fi terminată cu o filtrare virală și schimb de tampon. Într-un exemplu de schemă de purificare, mediul de cultură de celule este trecut peste o coloană cu proteină A, spălat în 150 mM Tris/NaCl (pH 8,0), apoi spălat în 50 mM Tris/NaCl (pH 8,0) și eluat cu 0,1 M glicină, pH 3,0. Eluatul cu pH scăzut este păstrat la temperatura camerei timp de 30 de minute ca o etapă de clearance viral. Eluatul este apoi neutralizat și trecut peste o coloană de schimb de ioni de Q-sefaroză și spălat în 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl și eluat în 50 mM Tris pH 8,0, cu o concentrație de

NaCl cuprinsă între 150 mM și 300 mM. Eluatul este apoi schimbat în 50 mM Tris pH 8,0, 1,1 M sulfat de amoniu și trecut peste o coloană de fenil sefaroză, spălat și eluat în 50 mM Tris pH 8,0 cu sulfat de amoniu între 150 și 300 mM. Eluatul este dializat și filtrat pentru utilizare.

Capcane de GDF suplimentare (proteinele de fuziune ActRIIB-Fc modificate astfel încât să reducă raportul legării activinei A în raport cu legarea miostatinei sau legării GDF11) sunt descrise în WO 2008/097541 și WO 2006/012627.

Exemplul 6: Bioanaliza pentru semnalizarea mediată de GDF11 și activină

O analiză a genei raportor A-204 a fost utilizată pentru a se evalua efectele proteinelor ActRIIB-Fc și ale capcanelor de GDF asupra semnalizării prin GDF-11 și activină A. Linia de celule: rhabdomyosarcom uman (derivat din mușchi). Vector reporter: pGL3 (CAGA) 12 (descriș în Dennler și colab, 1998, EMBO 17: 3091-3100). Motivul CAGA12 este prezent în genele care răspund la TGF-beta (*de exemplu*, Gena PAI-1), deci acest vector este de uz general pentru factorii de semnalizare prin SMAD2 și 3.

Ziua 1: Se împart celulele A-204 într-o placă cu 48 de godeuri.

Ziua 2: Celulele A-204 sunt transfectate cu 10 ug pGL3 (CAGA) 12 sau pGL3 (CAGA) 12 (10 ug) + pRLCMV (1 μg) și Fugene.

Ziua 3: Se adaugă factorii (diluati în mediu + 0,1% BSA). Inhibitorii trebuie preincubați cu factorii timp de 1 oră înainte de a se adăuga la celule. Șase ore mai târziu, celulele au fost clătite cu PBS și lizate.

Aceasta este urmată de o analiză de luciferază. În absența oricărui inhibitor, activina A a prezentat o stimulare de 10 ori a exprimării genei raportoare și o ED50 ~ 2 ng/ml. GDF-11: stimulare de 16 ori, ED50: ~ 1,5 ng/ml.

ActRIIB (20-134) este un inhibitor puternic de exemplu al activinei A, GDF-8 și GDF-11, în această analiză. Așa cum este descriș mai jos, variantele de ActRIIB au fost, de asemenea, testate în această analiză.

Exemplul 7: Variante de ActRIIB-Fc, activitate pe bază de celule

Activitatea proteinelor ActRIIB-Fc și a capcanelor de GDF a fost testată într-o analiză pe bază de celule, așa cum este descriș mai sus. Rezultatele sunt rezumate în tabelul de mai jos. Unele variante au fost testate în diferiți construcți de trunchiere C-terminali. După cum a fost discutat mai sus, trunchierile a cinci sau cincisprezece aminoacizi au determinat reducerea activității. Capcanele de GDF (variantele L79D și L79E) au dovedit o pierdere substanțială a inhibării activinei A, păstrând în același timp inhibarea aproape de tip sălbatic a GDF11.

Legarea ActRIIB-Fc solubil la GDF11 și Activina A:

Variații ActRIIB-Fc	Porțiune din ActRIIB (corespunde aminoacizilor din SEQ ID NO: 1)	Activitate de inhibare a GDF 11	Activitate de inhibare a activinei
R64	20-134	+++ (aprox. 10 ⁻⁸ M K _i)	+++ (aprox. 10 ⁻⁸ M K _i)
A64	20-134	+ (aprox. 10 ⁻⁶ M K _i)	+ (aprox. 10 ⁻⁶ M K _i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++

Variații ActRIIB-Fc	Porțiuni din ActRIIB (corespunde aminoacizilor din SEQ ID NO: 1)	Activitate de inhibare a GDF 11	Activitate de inhibare a activinei
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ Activitate slabă (aproximativ 1×10^{-6} K _i) ++ Activitate moderată (aproximativ 1×10^{-7} K _i) +++ Activitate bună (de tip sălbatic) (aproximativ 1×10^{-8} K _i) ++++ Mai mare decât activitatea de tip sălbatic			

Varianta A24N are activitate în analiza pe bază de celule (mai sus) și este echivalentă cu molecula de tip sălbatic. Varianta A24N și oricare dintre celelalte variante testate mai sus pot fi combinate cu moleculele de capcană de GDF, cum ar fi variantele L79D sau L79E.

Exemplul 8: Legarea GDF11 și Activinei A.

Legarea anumitor proteine ActRIIB-Fc și capcane de GDF la liganzi a fost testată printr-o analiză Biacore™.

Variantele ActRIIB-Fc sau proteina de tip sălbatic au fost capturate pe sistem utilizând un anticorp anti-hFc. Liganzii au fost injectați și au curs peste proteinele receptorului capturat. Rezultatele sunt rezumate în tabelele de mai jos.

Specificitatea de legare a ligandului la variante IIB.

	GDF11		
Proteină	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB(A24N 20- 134)-hFc	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
	GDF8		
Proteină	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)

	GDF11		
Proteină	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11

	Activină A		
Proteină	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Legare scăzută
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Legare scăzută
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

Aceste date obținute într-o analiză fără celule confirmă datele de testare bazate pe celule, demonstrând că varianta A24N păstrează activitatea de legare a ligandului similară cu cea a moleculei ActRIIB (20-134)-hFc și că molecula L79D sau L79E păstrează legarea miostatinei și a GDF11, dar prezintă o legare semnificativ scăzută (necuantificabilă) la activina A.

Alte variante au fost generate și testate, după cum s-a raportat în WO2006/012627. Vedeți, *de exemplu*, pag. 59-60, folosind liganzi cuplați la un dispozitiv și receptor care curge peste liganzii cuplați. În special, K74Y, K74F, K74I (și probabil alte substituții hidrofobe la K74, cum ar fi K74L) și D80I, determină o scădere a raportului de legare a activinei A (ActA) la legarea GDF11, în raport cu molecula de K74 de tip sălbatic. Un tabel de date cu privire la aceste variante este reprodus mai jos:

Variante solubile de ActRIIB-Fc care se leagă la GDF11 și Activina A (analiza Biacore™)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7M (+)	KD= (+) 2,6e-7M

WT (64R)	na	KD=	8,6e-8M
		(+++)	
+15coadă	KD	~2,6	e-8M
	(+++)		
		KD=	1,9e-8M
		(++++)	
E37A	*		*
R40A	-		-
D54A	-		*
K55A	++		*
R56A	*		*
K74A	KD=4,35e-9	M	KD=5,3e-9M
	+++++		+++++
K74Y	*		--
K74F	*		--
K74I	*		--
W78A	*		*
L79A	+		*
D80K	*		*
D80R	*		*
D80A	*		*
D80F	*		*
D80G	*		*
D80M	*		*
D80N	*		*
D80I	*		--
F82A	++		-
<p>* Nu se observă legare -- legare < 1/5 WT - legare ~ 1/2 WT + WT ++ legare crescută < 2x +++ legare crescută ~5x ++++ legare crescută ~10x +++++ legare crescută ~ 40x</p>			

Exemplul 9: Generarea unei capcane de GDF cu domeniu extracelular de ActRIIB trunchiat

O capcană GDF denumită ActRIIB (L79D 20-134)-hFc a fost generată prin fuziunea N-terminală a liderului TPA la domeniul extracelular ActRIIB (reziduurile 20-134 în SEQ ID NO: 1) conținând o substituție de leucină la aspartat (la reziduul 79 din SEQ ID NO: 1) și fuziunea C-terminală a domeniului Fc uman cu linker minim (trei

reziduuri de glicină) (Figura 10; SEQ ID NO: 74). O secvență de nucleotide corespunzătoare acestei proteine de fuziune este prezentată în Figura 11 (SEQ ID NO: 75, catena sens; și SEQ ID NO: 76, catena antisens).

O capcană de GDF cu domeniu extracelular ActRIIB trunchiat, denumită ActRIIB (L79D 25-131) -hFc, a fost generată prin fuziunea N-terminală a liderului TPA la domeniul extracelular trunchiat (reziduurile 25-131 din SEQ ID NO: 1) conținând o substituție leucină-la-aspartat (la reziduul 79 din SEQ ID NO: 1) și o fuziune C-terminală a domeniului Fc uman cu un linker minim (trei reziduuri de glicină) (Figura 12, SEQ ID NO: 77). Secvența formei purificate a celulei de ActRIIB (L79D 25-131) -hFc este prezentată în Figura 13 (SEQ ID NO: 78). O secvență de nucleotide care codifică această proteină de fuziune este prezentată în Figura 15 (SEQ ID NO: 80) împreună cu secvența sa complementară (SEQ ID NO: 81), și o secvență de nucleotide alternativă care codifică exact aceeași proteină de fuziune este prezentată în Figura 16 (SEQ ID NO: 82) și secvența sa complementară (SEQ ID NO: 83).

Exemplul 10: Legarea selectivă a ligandului de către capcana de GDF cu domeniul extracelular ActRIIB dublu-trunchiat

A fost evaluată afinitatea *in vitro* a capcanelor de GDF și a altor proteine ActRIIB-hFc pentru mai mulți liganzi cu un instrument Biacore™. Rezultatele sunt rezumate în tabelul de mai jos. Valorile K_d au fost obținute prin ajustarea afinității în stare staționară datorită asocierii și disocierii foarte rapide a complexului, care a împiedicat determinarea exactă a K_{on} și K_{off}.

Selectivitatea pentru ligand a variantelor de ActRIIB-hFc:

Construct de fuziune	Activina A (Kd e-11)	Activina B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB (L79 20-134) -hFc	1,6	1,2	3, 6
ActRIIB (L79D 20-134) -hFc	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB (L79 25-131) -hFc	1,8	1,2	3,1
ActRIIB (L79D 25-131) -hFc	2290,0	62,1	7,4

Capcana de GDF cu un domeniu extracelular trunchiat, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, a egalat sau a depășit selectivitatea pentru ligand prezentată de varianta mai lungă, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc, cu pierderi pronunțate de legare a activinei A, pierdere parțială a legării activinei B și păstrării aproape complete a legării GDF11 comparativ cu omologii ActRIIB-hFc lipsiți de substituția L79D. Este de reținut că trunchierea singură (fără substituție L79D) nu a modificat selectivitatea între liganzii prezentați aici [comparație ActRIIB (L79 25-131)-hFc cu ActRIIB (L79 20-134)-hFc]. ActRIIB (L79D 25-131)-hFc păstrează, de asemenea, legarea puternică până la intermediară a ligandului de semnalizare Smad 2/3 GDF8 și a liganzilor Smad 1/5/8 BMP6 și BMP10.

Exemplul 11: Capcana de GDF derivată din ActRIIB5

Alții au raportat o formă alternativă, solubilă de ActRIIB (denumită ActRIIB5), în care exonul 4, inclusiv domeniul transmembranar ActRIIB, a fost înlocuit cu o secvență C-terminal diferită (vezi, *de exemplu*, WO 2007/053775).

Secvența ActRIIB5 umană nativă fără liderul său este după cum urmează:
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWLD~~DD~~FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHE (SEQ ID NO: 50)

O substituție de leucină-la-aspartat sau alte substituții acide, pot fi efectuate în poziția nativă 79 (subliniată) așa cum este descris pentru a construi varianta ActRIIB5(L79D), care are următoarea secvență:
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWDD~~DD~~FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHE (SEQ ID NO: 51)

Această variantă poate fi conectată la Fc uman (subliniere cu linie dublă) cu un linker TGGG (sublinierea cu o linie simplă) pentru a genera o proteină de fuziune ActRIIB5(L79D)-hFc umană cu următoarea secvență:
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWDD~~DD~~FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHETTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL

FPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL

PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 52).

Această construcție poate fi exprimată în celule CHO.

Exemplul 12: Generarea unui heterodimer ALK4:ActRIIB

S-a construit un complex heteromeric ALK4-Fc:ActRIIB-Fc cuprinzând domeniile extracelulare ale ActRIIB umane și ALK4 umane, care sunt fiecare fuzionate separat la un domeniu Fc cu un linker poziționat între domeniul extracelular și domeniul Fc. Construcții individuale sunt denumiți polipeptidă de fuziune ActRIIB-Fc și, respectiv, polipeptidă de fuziune ALK4-Fc, și secvențele fiecăruia sunt prezentate mai jos.

O metodologie pentru promovarea formării complexilor heteromerici ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, spre deosebire de complexii homodimerici ActRIIB-Fc sau ALK4-Fc, constă în introducerea alterărilor în secvența de aminoacizi a domeniilor Fc pentru a ghida formarea complexilor heteromerici asimetrici. Multe abordări diferite pentru a se obține perechi de interacțiuni asimetrice utilizând domenii Fc sunt descrise în această dezvoltare.

Într-o abordare, ilustrată în secvențele polipeptidice ActRIIB-Fc și ALK4-Fc cu SEQ ID NO: 108 și 110 și SEQ ID NO: 111 și respectiv 113, un domeniu Fc este modificat pentru a se introduce aminoacizi cationici la fața de interacțiune, în timp ce celălalt domeniu Fc este modificat pentru a se introduce aminoacizi anionici la fața de interacțiune. Polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc și polipeptida de fuziune ALK4-Fc utilizează fiecare liderul activatorului plasminogen de țesut (TPA).

Secvența polipeptidică ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 108) este prezentată mai jos:

1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTPPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 108)

Secvența lider (semnal) și linkerul sunt subliniate. Pentru a promova formarea heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, mai degrabă decât oricare dintre complexii homodimerici posibili, pot fi introduse două substituții de aminoacizi (înlocuirea aminoacizilor acizi cu lizină) în domeniul Fc al proteinei de fuziune ActRIIB, așa cum este indicat prin sublinierea cu linie dublă de mai sus. Secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 108 poate fi furnizată opțional cu lizina (K) îndepărtată de la capătul C-terminal.

Această proteină de fuziune ActRIIB-Fc este codificată de următoarea secvență de acid nucleic (SEQ ID NO: 109):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
201 CTCCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
301 GAGAACCCCG AGGTGTA CTTCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
351 GCGCTTCACT CATTGTCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
401 CACCCCGGAC AGCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG
851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101 TAAA (SEQ ID NO: 109)

O polipeptidă de fuziune ActRIIB-Fc matură (SEQ ID NO: 110) este după cum urmează și poate fi opțional prevăzută cu lizina (K) îndepărtată de la capătul C-terminal.

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF
 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 110)

O formă complementară a polipeptidei de fuziune ALK4-Fc (SEQ ID NO: 111) este după cum urmează:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
 51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQQPENNY
 301 DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPG (SEQ ID NO: 111)

Secvența lider și linkerul sunt subliniate. Pentru a ghida formarea heterodimerului cu polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc a SEQ ID NO: 108 și 110 de mai sus, pot fi introduse două substituții de aminoacizi (înlocuirea lizinelor cu acizi aspartici) în domeniul Fc al polipeptidei de fuziune ALK4-Fc, așa cum este indicat prin sublinierea cu linie dublă de mai sus. Secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 111 poate fi furnizată opțional cu lizina (K) adăugată la capătul C-terminal.

Această proteină de fuziune ALK4-Fc este codificată de următorul acid nucleic (SEQ ID NO: 112):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
TGTGTGGAGC

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC
CAGGCTCTGC
101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG
TGAGACAGAT

151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTCAATCTG GATGGGATGG
AGCACCATGT

201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG
AAGCCCTTCT

251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG
CTACACTGAC

301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC
TCAAGGAGCC

351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT
GGAACTCACA

401 CATGCCACCC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC
GTCAGTCTTC

451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
GGACCCCTGA

501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
GAGGTCAAGT

551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
GACAAAGCCG

601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG
TCCTCACCGT

651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
AAGGTCTCCA

701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA
AGCCAAAGGG

751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
GGGAGGAGAT

801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
TTCTATCCCA

851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA
GAACAACTAC

901 GACACCACGC CTCCCCTGCT GGACTIONGAC GGCTCCTTCT
TCCTCTATAG

951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
GTCTTCTCAT

1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
GAAGAGCCTC

1051 TCCCTGTCTC CGGGT (SEQ ID NO: 112)

O secvență matură de proteină de fuziune ALK4-Fc (SEQ ID NO: 113) este după cum urmează și poate fi opțional prevăzută cu lizina (K) adăugată la capătul C-terminal.

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME
HHVRTCIPKV

51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL
KEPEHPSMWG

101 PVETGGGHTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
TPEVTCVVVD

151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN

201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
EEMTKNQVSL

251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTP PVLDSDGSEFF
LYSDLTVDKS

301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:
113)

Proteinele ActRIIB-Fc și ALK4-Fc ale SEQ ID NO: 110 și respectiv SEQ ID NO: 113, pot fi co-exprimate și purificate dintr-o linie de celule CHO, pentru a da naștere unui complex heteromeric cuprinzând ALK4-Fc:ActRIIB -Fc.

Într-o altă abordare pentru a promova formarea de complecși heteromultimerici folosind proteine de fuziune Fc asimetrice, domeniile Fc sunt modificate pentru a introduce interacțiuni complementare hidrofobe și o legătură de disulfură intermoleculară suplimentară, așa cum este ilustrat în secvențele polipeptidice

ActRIIB-Fc și ALK4-Fc din SEQ ID NO: 114 și 115 și SEQ ID NO: 116 și, respectiv, 117. Polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc și polipeptida de fuziune ALK4-Fc utilizează fiecare un lider activator de plasminogen de țesut (TPA).

Secvența polipeptidică ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 114) este prezentată mai jos:

```

1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA
NWELERTNQS

51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC
YDRQECVATE

101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT
GGGTHTCPPC

151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
DPEVKFNWYV

201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP

251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPECREEMT KNQVSLWCLV
KGFYPSDIAV

301  EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH

351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 114)

```

Secvența lider (semnal) și linkerul sunt subliniate. Pentru a promova formarea heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, mai degrabă decât oricare dintre complexii homodimerici posibili, pot fi introduse în domeniul Fc al proteinei de fuziune două substituții de aminoacizi (înlocuind o serină cu o cisteină și o treonină cu un triptofan), așa cum este indicat prin sublinierea cu linie dublă de mai sus. Secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 114 poate fi furnizată opțional cu lizina (K) îndepărtată de la capătul C-terminal.

O polipeptidă de fuziune ActRIIB-Fc matură este după cum urmează:

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC
YASWRNSSGT

51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC
NERFTHLPEA

101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS

151 RTPEVTCVVV DVSHEDEPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS

201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKQPR
EPQVYTLPPC

251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN QOPENNYKTT
PPVLDSGDSF

301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 115)

O formă complementară a polipeptidei de fuziune ALK4-Fc (SEQ ID NO: 116) este după cum urmează și poate fi furnizată opțional cu lizina (K) îndepărtată de la capătul C-terminal.

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVEFV SPGASGPRGV QALLCACTSC
LQANYTCETD

51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD
LRNTHCCYTD

101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA
PELLGGPSVF

151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFENWYVDG
VEVHNAKTKP

201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
IEKTISKAKG

251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY

301 KTTPPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL

351 SLSPGK (SEQ ID NO: 116)

Secvența lider și linkerul sunt subliniate. Pentru a ghida formarea heterodimerului cu polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc cu SEQ ID NO: 114 și 115 de mai sus, pot fi introduse patru substituții de aminoacizi în domeniul Fc al polipeptidei

de fuziune ALK4, așa cum este indicat prin sublinierea dublă de mai sus. Secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 116 poate fi furnizată opțional cu lizina (K) îndepărtată de la capătul C-terminal.

O secvență de proteine de fuziune ALK4-Fc matură este după cum urmează și poate fi furnizată opțional cu lizina (K) îndepărtată de la capătul C-terminal.

```

1  SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME
HHVRTCIPKV

51  ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL
KEPEHPSMWG

101 PVETGGGHTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
TPEVTCVVVD

151 VSHEDPEVKF NWWVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN

201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR
EEMTKNQVSL
251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSEFF
LVSKLTVDKS

301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:
117)

```

Proteinele ActRIIB-Fc și ALK4-Fc ale SEQ ID NO: 115 și respectiv SEQ ID NO: 117, pot fi co-exprimate și purificate dintr-o linie de celule CHO, pentru a da naștere unui complex heteromeric cuprinzând ALK4-Fc:ActRIIB-Fc.

Purificarea diferiților complecși ALK4-Fc:ActRIIB-Fc ar putea fi efectuată printr-o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu Q sefaroză, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografia de excludere dimensională și cromatografia cu schimb de cationi. Purificarea ar putea fi terminată cu o filtrare virală și schimb de tampon.

Într-o altă abordare pentru a promova formarea de complecși heteromultimerici utilizând proteine de fuziune Fc asimetrice, domeniile Fc sunt modificate pentru a se introduce interacțiuni hidrofobe complementare, o legătură de disulfură intermoleculară suplimentară și diferențe electrostatice între cele două domenii Fc pentru a facilita purificarea pe baza sarcinii moleculare nete, așa cum este ilustrat în secvențele polipeptidice ActRIIB-Fc și ALK4-Fc ale SEQ ID NO: 118-121 și respectiv 122-125. Polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc și polipeptida de fuziune ALK4-Fc utilizează fiecare un lider activator plasminogen de țesut (lider (TPA)).

Secvența polipeptidică ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 118) este prezentată mai jos:

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQŠ
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPFC
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT ENQVSLWCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQD SLSLSPG (SEQ ID NO: 118)

Secvența lider și linkerul sunt subliniate. Pentru a promova formarea heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, mai degrabă decât oricare dintre complexii homodimerici posibile, pot fi introduse în domeniul Fc al proteinei de fuziune două substituții de aminoacizi (înlocuind o serină cu o cisteină și o treonină cu un triptofan) așa cum este indicat prin sublinierea dublă de mai sus. Pentru a facilita purificarea heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, în domeniul Fc al proteinei de fuziune pot fi de asemenea introduse două substituții de aminoacizi (înlocuirea lizinelor cu aminoacizi acizi), așa cum este indicat prin subliniere dublă de mai sus. Secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 118 poate fi furnizată opțional cu o lizină adăugată la capătul C-terminal.

Această proteină de fuziune ActRIIB-Fc este codificată de următorul acid nucleic (SEQ ID NO: 119):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 151 GGCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 201 CTCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 301 GAGAACCCCC AGGTGTA CTTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 351 GCGCTTCACT CATTGCCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 401 CACCCCGAC AGCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGGA GGAGATGACC GAGAACCAGG
 851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGGAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
 1101 T (SEQ ID NO: 119)

Polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc matură este după cum urmează (SEQ ID NO: 120) și poate fi opțional prevăzută cu o lizină adăugată la capătul C-terminal.

```

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPOV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
251 REEMTENQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSE
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQDSL SLS PG

```

(SEQ ID NO: 120)

Această polipeptidă de fuziune ActRIIB-Fc este codificată de următorul acid nucleic (SEQ ID NO: 121):

```

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 CCCCAGGTG TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTG GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACCGGTGG
351 TGGAAC TAC ACATGCCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAAACCA AGGACACCCT CATGATCTCC
451 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
551 AGACAAAAGC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
601 GTCC TACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATGC
751 CGGGAGGAGA TGACCGAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG
801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
851 AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCCTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
901 TTCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
1001 AGGACAGCCT CTCCTGTCT CCGGGT (SEQ ID NO: 121)

```

Forma complementară a polipeptidei de fuziune ALK4-Fc (SEQ ID NO: 122) este după cum urmează și poate fi furnizată opțional cu lizina îndepărtată de la capătul C-terminal.

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
 51 GACMVSIENL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSSED LRNTHCCYTD
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQOPENNY
 301 KTTTPVLDSR GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPGK (SEQ ID NO: 122)

Secvența lider și linkerul sunt subliniate. Pentru a ghida formarea heterodimerului cu polipeptida de fuziune ActRIIB-Fc a SEQ ID NO: 118 și 120 de mai sus, patru substituții de aminoacizi (înlocuirea unei tirozine cu o cisteină, unei treonine cu o serină, unei leucine cu o alanină și unei tirozine cu o valină) pot fi introduse în domeniul Fc al polipeptidei de fuziune ALK4 așa cum este indicat prin subliniere dublă de mai sus. Pentru a facilita purificarea heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, două substituții de aminoacizi (înlocuirea unei asparagine cu o arginină și unui aspartat cu o arginină) pot fi de asemenea introduse în domeniul Fc al polipeptidei de fuziune ALK4-Fc, așa cum este indicat prin subliniere dublă de mai sus. Secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 122 poate fi furnizată opțional cu lizina îndepărtată de la capătul C-terminal.

Această polipeptidă de fuziune ALK4-Fc este codificată de următorul acid nucleic (SEQ ID NO: 123):

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
 151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAACTCACA
 401 CATGCCACCC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
 451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
 501 GGTACACATG GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
 701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT
 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA
 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA GAACAACCTAC
 901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCCGC GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG
 951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
 1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO: 123)

Secvența de polipeptidă de fuziune ALK4-Fc matură este după cum urmează (SEQ ID NO: 124) și poate fi furnizată opțional cu lizină îndepărtată de la capătul C-terminal.

```

1  SGPRGVQALL  CACTSCLQAN  YTCETDGACM  VSIFNLDGME  HHVRTCIPKV
51  ELVPAGKPFY  CLSSEDLRNT  HCCYTDYCNR  IDLRVPSGHL  KEPEHPSMWG
101  PVETGGGTHT  CPPCPAPELL  GGPSVFLFPP  KPKDTLMISR  TPEVTCVVVD
151  VSHEDPEVKF  NWYVDGVEVH  NAKTKPREEQ  YNSTYRVVSV  LTVLHQDWLN
201  GKEYKCKVSN  KALPAPIEKT  ISKAKGQPRE  PQVCTLPPSR  EEMTKNQVSL
251  SCAVKGFYPS  DIAVEWESRG  QPENNYKTPP  PVLDSRGSFF  LVSKLTVDKS
301  RWQQGNVFSK  SVMHEALHNN  YTQKSLSLSP  GK          (SEQ ID NO: 124)

```

Această polipeptidă de fuziune ALK4-Fc este codificată de următorul acid nucleic (SEQ ID NO: 125):

```

1  TCCGGGCCCC  GGGGGGTCCA  GGCTCTGCTG  TGTGCGTGCA  CCAGCTGCCT
51  CCAGGCCAAC  TACACGTGTG  AGACAGATGG  GGCCTGCATG  GTTTCCATTT
101  TCAATCTGGA  TGGGATGGAG  CACCATGTGC  GCACCTGCAT  CCCCAAAGTG
151  GAGCTGGTCC  CTGCCGGGAA  GCCCTTCTAC  TGCCTGAGCT  CGGAGGACCT
201  GCGCAACACC  CACTGCTGCT  ACACTGACTA  CTGCAACAGG  ATCGACTTGA
251  GGGTGCCAG  TGGTCACCTC  AAGGAGCCTG  AGCACCCGTC  CATGTGGGGC
301  CCGGTGGAGA  CCGGTGGTGG  AACTCACACA  TGCCACCGT  GCCCAGCACC
351  TGAACCTCTG  GGGGGACCGT  CAGTCTTCTT  CTTCCCCCCA  AAACCCAAGG
401  ACACCCTCAT  GATCTCCCGG  ACCCCTGAGG  TCACATGCGT  GGTGGTGGAC
451  GTGAGCCACG  AAGACCCTGA  GGTCAAGTTC  AACTGGTACG  TGGACGGCGT
501  GGAGGTGCAT  AATGCCAAGA  CAAAGCCGCG  GGAGGAGCAG  TACAACAGCA
551  CGTACCGTGT  GGTCAGCGTC  CTCACCGTCC  TGCACCAGGA  CTGGCTGAAT
601  GGCAAGGAGT  ACAAGTGCAA  GGTCTCCAAC  AAAGCCCTCC  CAGCCCCCAT
651  CGAGAAAACC  ATCTCAAAG  CCAAAGGGCA  GCCCGAGAA  CCACAGGTGT
701  GCACCCTGCC  CCCATCCCGG  GAGGAGATGA  CCAAGAACCA  GGTCAGCCTG
751  TCCTGCGCCG  TCAAAGGCTT  CTATCCCAGC  GACATCGCCG  TGGAGTGGGA
801  GAGCCGCGGG  CAGCCGGAGA  ACAACTACAA  GACCACGCCT  CCCGTGCTGG
851  ACTCCCGCGG  CTCCTTCTTC  CTCGTGAGCA  AGCTCACCGT  GGACAAGAGC
901  AGGTGGCAGC  AGGGGAACGT  CTTCTCATGC  TCCGTGATGC  ATGAGGCTCT
951  GCACAACCAC  TACACGCAGA  AGAGCCTCTC  CCTGTCTCCG  GGTA

```

(SEQ ID NO: 125)

Proteinele ActRIIB-Fc și ALK4-Fc cu SEQ ID NO: 120 și respectiv SEQ ID NO: 124, pot fi co-exprimate și purificate dintr-o linie de celule CHO, pentru a da naștere unui complex heteromeric care cuprinde ALK4-Fc:ActRIIB-Fc.

Purificarea diferiților complecși ALK4-Fc:ActRIIB-Fc ar putea fi realizată printr-o serie de etape de cromatografie pe coloană, incluzând, de exemplu, trei sau mai multe dintre următoarele, în orice ordine: cromatografie cu proteină A, cromatografie cu Q sefaroză, cromatografie cu fenilsefaroză, cromatografie de excludere dimensională, cromatografie cu schimb de cationi, cromatografie de afinitate pe bază de epitop (de exemplu, cu un anticorp sau un ligand echivalent funcțional îndreptat împotriva unui epitop pe ALK4 sau ActRIIB) și cromatografie multimodală (de exemplu,

cu rășină care conține atât liganzi electrostatici, cât și hidrofobi). Purificarea ar putea fi terminată cu o filtrare virală și schimb de tampon.

Exemplul 13. Profilul de legare a ligandului a heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc comparativ cu homodimerul ActRIIB-Fc și homodimerul ALK4-Fc

O analiză de legare bazată pe Biacore™ a fost utilizată pentru a compara selectivitatea legării ligandului a complexului heterodimeric ALK4-Fc:ActRIIB-Fc descris mai sus cu cel al complexelor homodimerice ActRIIB-Fc și ALK4-Fc. Heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, homodimerul ActRIIB-Fc și homodimerul ALK4-Fc au fost capturați independent pe sistem utilizând un anticorp anti-Fc. Liganzii au fost injectați și au fost lăsați să curgă peste proteina receptorului capturat. Rezultatele sunt rezumate în tabelul de mai jos, în care (k_d) off-rate ale ligandului cele mai indicative ale capcanelor eficiente pentru ligand sunt notate prin umbrire gri.

Profilul de legare a ligandului de către heterodimerul ALK4-Fc :ActRIIB-Fc comparativ cu homodimerul ActRIIB-Fc și homodimerul ALK4-Fc :ActRIIB-Fc									
Ligand	Homodimer ActRIIB-Fc			Homodimer ALK4-Fc			Heterodimer ALK4-Fc:ActRIIB-Fc		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (1/pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (1/pM)
Activina A	1,2 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁻⁴	19	5,8 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁻²	20000	1,3 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁻⁴	12
Activina B	5,1 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁻⁴	20	Fără legare			7,1 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁻⁵	6
BMP6	3,2 x 10 ⁷	6,8 x 10 ⁻³	190	---			2,0 x 10 ⁶	5,5 x 10 ⁻³	2700
BMP9	1,4 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁻³	77	---			Tranzitoriu*		3400
BMP10	2,3 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁻⁴	11	---			5,6 x 10 ⁷	4,1 x 10 ⁻³	74
GDF3	1,4 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁻³	1500	---			3,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁻²	4900
GDF8	8,3 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁻⁴	280	1,3 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁻³	15000 [†]	3,9 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁻⁴	550
GDF11	5,0 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁻⁴	2	5,0 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁻³	270 [†]	3,8 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁻⁴	3

* Nedeterminat din cauza naturii tranzitorii a interacțiunii
[†] Semnal foarte scăzut
 --- Netestat

Aceste date de legare comparative demonstrează că heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc are un profil/selectivitate de legare modificat în raport cu homodimerii ActRIIB-Fc sau ALK4-Fc. Heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc afișează o legare îmbunătățită la activina B comparativ cu oricare homodimer, păstrează legarea

puternică la activina A, GDF8 și GDF11, așa cum s-a observat cu homodimerul ActRIIB-Fc și prezintă o legare substanțial redusă la BMP9, BMP10 și GDF3. În special, BMP9 prezintă o afinitate scăzută sau neobservabilă pentru heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, în timp ce acest ligand se leagă puternic de homodimerul ActRIIB-Fc. La fel ca homodimerul ActRIIB-Fc, heterodimerul păstrează legarea la nivel intermediar la BMP6. Vezi Figura 19.

În plus, s-a folosit un o analiză a genei raportoare A-204 pentru a se evalua efectele heterodimerului ALK4-Fc:ActRIIB-Fc și al homodimerului ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc asupra semnalizării prin activina A, activina B, GDF11, GDF8, BMP10 și BMP9. Linia celulară: Rabdiosarcom uman (derivat din mușchi). Vector raportor: pGL3 (CAGA)12 (așa cum este descris în Dennler și colab, 1998, EMBO 17: 3091-3100). Motivul CAGA12 este prezent în genele care răspund la TGF β (gena PAI-1), deci acest vector este de uz general pentru factorii de semnalizare prin Smad2 și 3. O analiză cu genă raportor A-204 exemplară este prezentată mai jos.

Ziua 1: Se împart celulele A-204 într-o placă cu 48 de godeuri

Ziua 2: Celulele A-204 sunt transfectate cu 10 ug pGL3 (CAGA) 12 sau pGL3 (CAGA) 12 (10 ug) + pRLCMV (1 ug) și Fugene.

Ziua 3: Se adaugă factorii (diluți în mediu + 0,1% BSA). Inhibitorii trebuie preincubați cu factorii timp de aproximativ o oră înainte de a se adăuga la celule. Aproximativ șase ore mai târziu, celulele sunt clătite cu PBS și apoi lizate.

Urmând pașii de mai sus, s-a efectuat un test de Luciferază.

În această analiză s-a determinat că atât heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, cât și homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc sunt inhibitori puternici ai activinei A, activinei B, GDF11 și GDF8. În special, așa cum se poate observa în datele comparative IC₅₀ homodimer/heterodimer ilustrate în Figura 19, heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc inhibă căile de semnalizare prin activina A, activina B, GDF8 și GDF11 similar cu homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Cu toate acestea, inhibarea de către heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc a căilor de semnalizare BMP9 și BMP10 este semnificativ redusă în comparație cu homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc. Aceste date sunt în concordanță cu datele de legare discutate mai sus, din care s-a observat că atât heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, cât și homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc prezintă o legare puternică la activina A, activina B, GDF8 și GDF11, dar BMP10 și BMP9 au o afinitate redusă semnificativ pentru heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc comparativ cu homodimerul ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc.

Împreună, aceste date demonstrează, prin urmare, că heterodimerul ALK4-Fc:ActRIIB-Fc este un antagonist mai selectiv al activinei A, activinei B, GDF8 și GDF11 comparativ cu homodimerul ActRIIB-Fc. În consecință, un heterodimer ALK4-Fc:ActRIIB-Fc va fi mai util decât un homodimer ActRIIB-Fc în anumite aplicații în care un astfel de antagonism selectiv este avantajos. Exemplele includ aplicații terapeutice în care este de dorit să se păstreze antagonismul unuia sau mai multora dintre activina A, activina B, activina AC, GDF8 și GDF11, dar să se minimizeze antagonismul unuia sau mai multora dintre BMP9, BMP10, GDF3 și BMP6.

Exemplul 14: Efectele unei polipeptide ActRII și a heterodimerului ALK4:ActRIIB asupra hipertensiunii pulmonare la un model de șobolan monocrotalin

Efectele unei proteine de fuziune ActRIIA-mFc (homodimer ActRIIA-mFc descris în Exemplul 1), un heterodimer ALK4-Fc:ActRIIB-Fc (descris în Exemplele 12 și 13) și a sildenafilului (un inhibitor de fosfodiesterază-5 aprobat pentru tratamentul PAH) au fost examinate într-un model de hipertensiune arterială pulmonară (PAH) la șobolan. În acest model, șobolanii Sprague Dawley au primit o injecție subcutanată de monocrotalină (MCT) pentru a induce PAH cu 24 de ore înainte de începerea terapiei.

Șobolanii au fost separați în diferite grupuri de tratament (10 șoareci per grup): 1) tratament cu MCT (60 mg/kg administrat i.p. ca doză unică în ziua 1 de studiu) și soluție salină tamponată Tris (i.p. ca 1 ml/kg, la fiecare trei zile) (grup de tratament vehicul), 2) tratament cu o polipeptidă ActRIIA-mFc (10 mg/kg administrat (i.p. la fiecare trei zile) și MCT (60 mg/kg administrat (i.p. ca doză unică în ziua 1 de studiu), 3) tratament cu un heterodimer ALK4-Fc:ActRIIB-Fc (10 mg/kg administrat (i.p. la fiecare trei zile) și MCT (60 mg/kg administrat (i.p. ca doză unică în ziua 1 a studiului), 4) tratament cu sildenafil (30 mg/kg administrat oral de două ori pe zi) și MCT (60 mg/kg administrat (i.p. ca doză unică în ziua 1 de studiu) și 5) șobolani martor (soluție salină tamponată Tris administrată i.p. la 1 ml/kg, la fiecare trei zile). Șobolanii au fost tratați timp de 28 de zile. Greutățile corporale au fost înregistrate înainte de prima doză în ziua 1 și apoi săptămânal pe parcursul studiului.

În ziua 28, șobolanii au fost anesteziați printr-o injecție intraperitoneală cu ketamină/xilazină (80/10 mg/kg). S-a făcut o incizie în gât, și a fost izolată o venă jugulară și ligată anterior. Un cateter de presiune umplut cu fluid a fost introdus în vena jugulară dreaptă pentru a se măsura presiunea arterei pulmonare (PAP). O altă incizie a fost făcută în regiunea inghinală, iar artera femurală a fost izolată și ligată anterior. Un cateter de presiune Millar a fost introdus într-o arteră femurală pentru a se măsura presiunea arterială sistolică, presiunea diastolică și ritmul cardiac. Presiunea arterială medie și PAP dreapta au fost monitorizate utilizând sistemul de captare a datelor Notocord HEM (Croissy sur Seine, Franța) v3.5 timp de aproximativ 5-10 minute până când s-au obținut măsurători stabile. În timpul măsurătorilor, șobolanii au fost menținuți la aproximativ 37°C pe un covoraș de încălzire și temperatura corpului a fost monitorizată pe tot parcursul procedurii cu o sondă de temperatură rectală. La încheierea procedurii, șobolanii au fost eutanasiați, iar inimile și plămânii au fost îndepărtați. Întreaga inimă a fost cântărită. Apoi, atriile au fost îndepărtate și ventriculul stâng cu sept (LV + S) a fost separat de ventriculul drept (RV). Ventriculele au fost cântărite separat. Hipertrofia a fost evaluată, parțial, prin calcularea RV/LV + S. Plămânii au fost, de asemenea, cântăriți.

În comparație cu animalele martor, șobolanii tratați cu monocrotalină (grupul de tratament cu vehicul) s-au observat că au greutate corporală scăzută, PAP crescut, hipertrofie cardiacă dreaptă și greutate pulmonară crescută, indicând stabilirea PAH. Șobolanii tratați cu sildenafil nu au avut nicio îmbunătățire a greutății corporale comparativ cu șobolanii tratați cu monocrotalină. Cu toate acestea, tratamentul cu sildenafil a redus cu 30% PAP mărit, a scăzut hipertrofia cardiacă dreaptă cu 18,5% și a scăzut greutatea pulmonară cu 10% comparativ cu șobolanii tratați cu monocrotalină. Surprinzător, s-a constatat că atât ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, cât și ActRIIA-mFc au efecte semnificativ mai mari în tratarea PAH în acest model, comparativ cu sildenafilul. De exemplu, tratamentul cu ALK4-Fc:ActRIIB-Fc a avut ca rezultat îmbunătățirea greutății corporale (+ 5,1%), reducerea cu 44,6% a PAP mărită scăderea hipertrofiei cardiace drepte cu 39,6% și scăderea greutății pulmonare cu 19,0%. În timp ce tratamentul cu ActRIIA-mFc nu a prezentat nicio îmbunătățire a greutății corporale, acesta a avut efecte semnificative în tratarea altor complicații ale PAH. De exemplu, tratamentul cu ActRIIA-Fc a avut ca rezultat o reducere cu 68% a PAP mărită, scăderea hipertrofiei cardiace drepte cu 47,1% și scăderea greutății pulmonare cu 18,4%.

Tendințe similare au fost observate în ceea ce privește muscularizarea vaselor pe baza scorului histopatologic. După colorarea probelor de țesut pentru a detecta α SMA/elastină, 100 de arteriole pulmonare, cu dimensiuni cuprinse între 10 μ m și 50 μ m, pe animal, au fost clasificate ca fiind nemuscularizate, parțial muscularizate sau complet muscularizate. Arteriolele pulmonare de la șobolanii tratați cu vehicul au fost

determinate ca fiind 62,3% complet muscularizate, 36,4% parțial muscularizate și 1,4% nemuscularizate. Tratamentul cu sildenafil a avut numai un efect modest asupra scăderii musculaturii vaselor (de exemplu, arteriolele pulmonare fiind 57,9% complet muscularizate, 41,6% parțial muscularizate și 0,9% nemuscularizate). În schimb, tratamentul cu ActRIIA-mFc a condus la scăderi semnificative ale muscularizării vaselor în comparație cu animalele tratate cu sildenafil (de exemplu, arteriolele pulmonare fiind 25,8% complet muscularizate, 66,9% parțial muscularizate și 7,3% nemuscularizate comparativ cu animalele tratate cu vehicul). Scorul histopatologic al hipertrofiei mușchilor netezi a arteriolelor pulmonare a fost, de asemenea, înregistrat după cum urmează: 0 (normal), 1 (minim), 2 (ușor), 3 (moderat) sau 4 (marcat). Șobolanii tratați cu vehicul au avut o hipertrofie medie a mușchilor netezi de moderat până la marcat (scor 3,8). Din nou, s-a observat că tratamentul cu sildenafil are un efect modest asupra hipertrofiei, cu un scor mediu de 3 (moderat). În timp ce la animalele tratate cu ActRIIA-mFc s-a observat că au o reducere semnificativă a hipertrofiei musculaturii netede (scor mediu de 1,6) comparativ cu animalele tratate cu vehicul și cu sildenafil. În general, tratamentul cu ActRIIA-mFc a redus semnificativ musculatura și hipertrofia vaselor în acest model de PAH.

Împreună, aceste date demonstrează că atât ActRIIA-mFc, cât și ALK4-Fc:ActRIIB-Fc sunt eficiente pentru ameliorarea diverselor complicații ale PAH în acest model indus de monocrotalină. În special, atât ActRIIA-mFc, cât și ALK4-Fc:ActRIIB-Fc au avut un efect mai mare în reducerea presiunii arteriale, a hipertrofiei cardiace drepte și a muscularizării vasculare decât s-a observat pentru sildenafil, care este un medicament aprobat pentru tratamentul PAH. Mai mult, datele indică faptul că alți antagoniști de GDF/BMP, în special cei care au activități similare cu ActRIIA-mFc și ALK4-Fc:ActRIIB-Fc, pot fi utili în tratamentul PAH, în special pentru prevenirea sau reducerea severității diferitelor complicații ale PAH.

Exemplul 15: Efectele unei polipeptide ActRII și heterodimerului ALK4:ActRIIB asupra hipertensiunii pulmonare în modelul de hipoxie Sugén la șobolan

Efectele unei proteine de fuziune ActRIIA-mFc (homodimerul ActRIIA-mFc descris în Exemplul 1 și a sildenafilului (un inhibitor al fosfodiesterazei-5 aprobat pentru tratamentul PAH) au fost examinate în continuare în modelul de hipoxie Sugén a PAH. În acest model, șobolanii primesc doze zilnice de semaxanib și sunt plasate într-un mediu cu oxigen scăzut (aproximativ 13% oxigen) pentru a induce PAH cu 24 de ore înainte de începerea terapiei.

Șobolanii au fost separați în diferite grupuri de tratament (10 șoareci per grup): 1) tratament cu semaxanib (200 mg/kg administrat s.c. ca doză unică zilnic)/hipoxie și soluție salină tamponată Tris (administrată i.p. ca 1 ml/kg, la fiecare trei zile) (grup de tratament cu vehicul), 2) tratament cu polipeptidă ActRIIA-mFc (10 mg/kg administrat i.p. la fiecare trei zile) și semaxanib (200 mg/kg administrat s.c. ca doză unică zilnic)/hipoxie, 3) tratament cu sildenafil (30 mg/kg administrat oral de două ori pe zi) și semaxanib (200 mg/kg administrat ca doză unică zilnic)/hipoxie și 4) șobolani martor (soluție salină tamponată Tris administrată i.p. ca 1 ml/kg, la fiecare trei zile). Șobolanii au fost tratați timp de 28 de zile. Greutățile corporale au fost înregistrate înainte de prima doză în ziua 1 și apoi săptămânal pe tot parcursul studiului.

În ziua 28, șobolanii au fost aneșteziți cu o injecție intraperitoneală de ketamină/xilazină (80/10 mg/kg). S-a făcut o incizie în gât, și o venă jugulară a fost izolată și ligată anterior. Un cateter de presiune umplut cu fluid a fost introdus în vena jugulară dreaptă pentru a se măsura presiunea arterei pulmonare (PAP). O altă incizie a fost făcută în regiunea inghinală, iar artera femurală a fost izolată și ligată anterior. Un cateter de presiune Millar a fost introdus într-o arteră femurală pentru a se măsura

presiunea arterială sistolică, presiunea diastolică și ritmul cardiac. Presiunea arterială medie și PAP dreapta au fost monitorizate utilizând sistemul de captare a datelor Notocord HEM (Croissy sur Seine, Franța) v3.5 timp de aproximativ 5-10 minute până când s-au obținut măsurători stabile. În timpul măsurătorilor, șobolanii au fost menținuți la aproximativ 37°C pe un tampon de încălzire și temperatura corpului a fost monitorizată pe tot parcursul procedurii cu o sondă de temperatură rectală. La încheierea procedurii, șobolanii au fost eutanasiați, iar inimile și plămânii au fost îndepărtați. Întreaga inimă a fost cântărită. Apoi, atriile au fost îndepărtate și ventriculul stâng cu sept (LV + S) a fost separat de ventriculul drept (RV). Ventriculele au fost cântărite separat. Hipertrofia a fost evaluată, parțial, prin calcularea RV/LV + S. Plămânii au fost, de asemenea, cântăriți.

Comparativ cu animalele martor, șobolanii tratați cu semaxanib/hipoxie (grupul de tratament cu vehicul) s-au observat că au greutatea corporală scăzută, PAP crescut, hipertrofie cardiacă dreaptă și greutate pulmonară crescută, indicând stabilirea PAH. Tratamentul cu sildenafil a redus presiunea arterială pulmonară medie cu 22,4% și a scăzut hipertrofia cardiacă dreaptă cu 10% comparativ cu animalele tratate cu vehicul. Din nou, s-a constatat că tratamentul cu ActRIIA-mFc are efecte semnificativ mai mari în tratarea PAH în acest model, comparativ cu sildenafilul. De exemplu, tratamentul cu ActRIIA-mFc a condus la o reducere a presiunii arteriale pulmonare medii cu 51,3% și a scăzut hipertrofia cardiacă dreaptă cu 53,5% comparativ cu animalele tratate cu vehicul.

Tendențe similare au fost observate în ceea ce privește muscularizarea vaselor pe baza scorului histopatologic. După colorarea probelor de țesut pentru a se detecta α SMA/elastină, 100 de arteriole pulmonare, cu dimensiuni cuprinse între 10 μ m și 50 μ m, pe animal au fost clasificate ca fiind nemuscularizate, parțial muscularizate sau complet muscularizate. S-a stabilit că arteriolele pulmonare de la șobolanii tratați cu vehiculul sunt 72,5% complet muscularizate, 27,4% parțial muscularizate și 0,1% nemuscularizate. Tratamentul cu sildenafil a avut numai un efect modest asupra scăderii muscularizării vaselor (de exemplu, arteriolele pulmonare fiind 67,4% complet muscularizate, 31,6% parțial muscularizate și 1,0% nemuscularizate) comparativ cu animalele tratate cu vehiculul. În schimb, tratamentul cu ActRIIA-mFc a condus la scăderi semnificative ale muscularizării vaselor în comparație cu animalele tratate cu sildenafil (de exemplu, arteriolele pulmonare fiind 29,3% complet muscularizate, 69,3% parțial muscularizate și 1,4% nemuscularizate comparativ cu animalele tratate cu vehiculul). Scorul histopatologic al hipertrofiei mușchilor netezi a arteriolelor pulmonare a fost, de asemenea, înregistrat după cum urmează: 0 (normal), 1 (minim), 2 (ușor), 3 (moderat) sau 4 (marcat). Șobolanii tratați cu vehicul au avut o hipertrofie medie a mușchilor netezi de la moderat până la marcat (scor 3,6). Din nou, s-a observat că tratamentul cu sildenafil are un efect modest asupra hipertrofiei, cu un scor mediu de 3 (moderat). În timp ce la animalele tratate cu ActRIIA-mFc s-a observat că au o reducere semnificativă a hipertrofiei musculaturii netede (scor mediu de 1,4) comparativ cu animalele tratate cu sildenafil. În general, tratamentul cu ActRIIA-mFc a redus semnificativ muscularizarea și hipertrofia vaselor în acest model de PAH.

Împreună, aceste date demonstrează că ActRIIA-mFc este eficient în ameliorarea diverselor complicații ale PAH în modelul de hipoxie Sugden. În special, ActRIIA-mFc a avut un efect mai mare în reducerea presiunii arteriale, a hipertrofiei cardiace drepte și a muscularizării vaselor decât s-a observat pentru sildenafil, care este un medicament aprobat pentru tratamentul PAH. În plus, datele indică faptul că alți antagoniști de GDF/BMP, în special cei care au activități similare cu ActRIIA-mFc

pot fi utili în tratamentul PAH, în special pentru prevenirea sau reducerea severității diferitelor complicații ale PAH.