



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107412734 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201710167937.1

(22)申请日 2008.09.17

(30)优先权数据

60/994399 2007.09.18 US

(62)分案原申请数据

200880117524.1 2008.09.17

(71)申请人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72)发明人 J.克诺普夫 J.西拉 M.L.谢尔曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 杜艳玲 万雪松

(51)Int. Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书33页

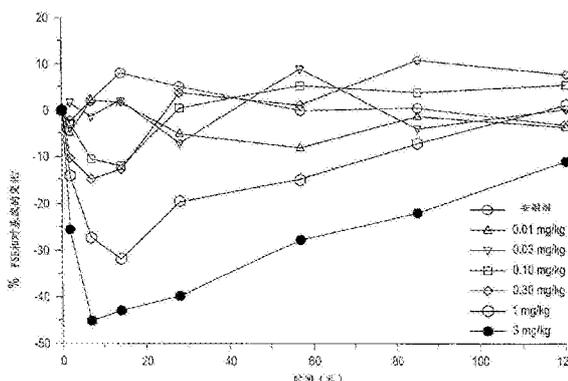
序列表13页 附图32页

(54)发明名称

活化素-ACTRIIA拮抗剂和减少或抑制FSH分泌的用途

(57)摘要

在某些方面,本发明提供了用于降低患者中FSH水平的组合物和方法。所述患者可,例如,诊断为患有FSH相关紊乱或需要延迟或抑制生殖细胞成熟。



1. 在患有FSH相关紊乱的人对象中降低FSH水平的方法,该方法包括给予所述对象有效降低对象中FSH 活性的量的ActRIIa-Fc融合蛋白,其中ActRIIa-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少 90%相同的氨基酸序列。

活化素-ACTRIIA拮抗剂和减少或抑制FSH分泌的用途

[0001] 本申请是国际申请日为2008年9月17日、国际申请号为PCT/US2008/010868、进入国家阶段的申请号为200880117524.1、发明名称为“活化素-ACTRIIA拮抗剂和减少或抑制FSH分泌的用途”的PCT申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2007年9月18号提交的美国临时申请序号60/994,399的权益。以上引用申请的所有教导都通过参考纳入本文。

背景技术

[0004] 促卵泡激素 (FSH) 由脑垂体释放并调控性腺的功能以及配子的产生和成熟。通常在先期释放引发激素例如促性腺激素释放激素之后,由性腺释放FSH。

[0005] FSH的释放对于女性排卵和男性精子成熟是必需的。在女性中,FSH刺激卵巢中卵泡粒膜细胞增殖并影响雌激素(一种参与卵泡成熟和排卵的激素)合成。男性中,FSH参与精子细胞成熟。更具体而言,FSH在男性中作用于塞托利氏(Sertoli)细胞,认为这些细胞是激素的靶标并且支持精子成熟过程(精子发生)。前列腺中也产生FSH,在这里它是细胞生长的重要调节物。

[0006] 因此,FSH释放的抑制剂可在男性和女性中用作避孕剂。

[0007] 除对生殖力的功能之外,FSH还在几种疾病状态中发挥作用。FSH受体的水平增加与前列腺癌相关,其中最高的FSH受体水平与激素不应性前列腺癌相关。前列腺癌是美国男性中最常见的癌症,每年新诊断病例超过230,000。2004年前列腺癌约导致了30,000例死亡(Jemal A,Tiwari R C,Murray T.Ghafoor A,Samuels A,Ward E,Feuer E J,Thun M J.Cancer statistics 2004.CA Cancer J.Clin.54:8-29,2004)。用手术或辐射治疗的个体约有40%会发展复发性前列腺癌(Walsh P C,Retik A B,Vaughan E D,eds.Campbell's Urology.第7版,Philadelphia,Pa.:WB Saunders Company;1998)。对复发性前列腺癌的最常见治疗是通过睾丸切除术、雌激素治疗、抗雄激素给药、和/或GnRH激动剂/拮抗剂治疗来抑制睾丸产生睾酮。这种治疗通常缓解疾病2-3年,然后前列腺癌即变为“激素不应性的”,意思是前列腺癌发展出了尽管血液雄激素浓度降低到去势水平但其仍然能够生长的能力。因此,需要用于治疗前列腺癌特别是激素不应性前列腺癌的改进的组合物和方法。

[0008] 垂体瘤(腺瘤)是非癌性生长物,取决于肿瘤的具体位置,通常影响不同的激素产生区域。垂体瘤约占颅内肿瘤的15%,并且由于局部压力作用、激素分泌过多或治疗相关的内分泌缺乏,垂体瘤与高发病率(morbidity)相关(Heaney A.P.,et al.:Molecular Pathogenesis of Pituitary Tumors.Oxford Textbook of Endocrinology,Wass J.A.H.and Shalet S.M.,(Eds.),Oxford University Press,Oxford,2002(in press))。绝大部分垂体腺瘤是良性的,相对生长缓慢。然而,垂体瘤可导致一种或多种垂体激素产生过多。FSH分泌型垂体瘤常导致多囊卵巢的发生并导致雌二醇水平升高。雌二醇水平的升高进而导致健康风险,包括子宫内膜癌和前列腺癌。因此,需要用于治疗与FSH分泌型垂体瘤相关症状的改进的组合物和方法。

[0009] 因此,抑制FSH分泌的化合物可用于多种治疗中。

[0010] 本公开的一个目的是提供可用于降低FSH水平的方法和组合物,这些方法和组合物可用于,例如,避孕和用于治疗多种FSH相关紊乱。

发明内容

[0011] 部分地,本公开涉及使用活化素拮抗剂以及ActRIIa拮抗剂减少或抑制FSH分泌。具体而言,本公开提供了使用ActRIIa的可溶形式减少或抑制FSH分泌的方法,所述ActRIIa的可溶形式用作活化素的抑制剂。虽然可溶性ActRIIa可通过活化素拮抗之外的机制影响FSH分泌,然而可在活化素拮抗或ActRIIa拮抗或二者的基础上选择所需的治疗剂。本文将这些治疗剂统称为活化素-ActRIIa拮抗剂。因此,在某些实施方案中,本公开提供了使用活化素-ActRIIa拮抗剂在有此需要的患者中减少或抑制FSH分泌的方法,所述活化素-ActRIIa拮抗剂包括例如,活化素结合(activin-binding) ActRIIa多肽、抗-活化素抗体、抗-ActRIIa抗体、活化素-或ActRIIa-靶向的小分子和适配体、以及降低活化素和ActRIIa表达的核酸。如美国专利公开号2007/0249022(通过参考纳入本文)所述,活化素-ActRIIa拮抗剂可用于促进骨生长和增加骨密度。如本文所述,这些拮抗剂还可用于减少或抑制FSH分泌。

[0012] 在某些方面,本公开提供了使用多肽减少或抑制FSH分泌的方法,所述多肽包含能结合于活化素的可溶性活化素结合ActRIIa多肽。ActRIIa多肽可制成包含活化素结合ActRIIa多肽和和药学上可接受的载体的药物制剂。所述活化素结合ActRIIa多肽结合于活化素的 K_D 可小于 $1\mu\text{M}$ 或小于100、10或 1nM 。任选地,相比于GDF11和/或GDF8,所述活化素结合ActRIIa多肽选择性结合活化素,并且其结合活化素的 K_D 任选至少比结合GDF11和/或GDF8的低10倍、20倍或50倍。虽然不希望受限于特定作用机制,但是预期超过GDF11/GDF8抑制的这种程度的活化素抑制选择性说明了对FSH分泌的作用,而没有对肌肉有一致的可测量的作用。在许多实施方案中,为引起少于15%、少于10%或少于5%的肌肉增加,会选择实现对FSH分泌理想作用的剂量的ActRIIa多肽。如尺寸排阻层析所测定,就其他多肽组分而言,所述组合物的纯度可以至少是95%,任选地,所述组合物的纯度至少是98%。这样的制剂中使用的活化素结合ActRIIa多肽可以是本文公开的任意多肽,如具有选自SEQ ID NOs:2、3、7或12的氨基酸序列的多肽,或与选自SEQ ID NOs:2、3、7、12或13的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%相同性的多肽。活化素结合ActRIIa多肽可以包括天然ActRIIa多肽的功能性片段,如包含选自SEQ ID NOs:1-3的序列或缺少C末端10至15个氨基酸(“尾部”)的SEQ ID NO:2的序列的至少10、20或30个氨基酸的功能性片段。

[0013] 在某些方面,本公开提供了在患有FSH相关紊乱的人对象中降低FSH水平的方法。此方法可包括给予所述对象可有效降低对象中FSH活性的量的ActRIIa-Fc融合蛋白。在某些方面,本公开提供了在需要延迟或抑制他或她的生殖细胞成熟的患者中降低FSH水平的方法。此方法可包括给予可有效降低对象中FSH活性的量的ActRIIa-Fc融合蛋白。ActRIIa-Fc融合蛋白可包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少90%、95%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。ActRIIa-Fc融合蛋白可以是由两个多肽形成的二聚体,两个多肽中的每一个包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少90%、95%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。ActRIIa-Fc融合蛋白可包含三个或更多个唾液酸部分,具体是

三个、四个或五个唾液酸部分。ActRIIa-Fc融合蛋白可以由CHO产生。ActRIIa-Fc融合蛋白可具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列。可给予ActRIIa-Fc融合蛋白从而在患者中达到至少0.3mg/kg的血清浓度,优选达到0.3至3mg/kg范围内的血清浓度。ActRIIa-Fc融合蛋白可具有15-30天的血清半衰期,并且给予对象的频率例如不多于每周一次、每月一次或每年一次。某些实施方案中,静脉内给药或皮下给药时,ActRIIa-Fc融合蛋白在正常的健康人中具有平均25至32天的血清半衰期和同等的生物利用度(equivalent bioavailability)。ActRIIa-Fc融合蛋白可静脉内给药或皮下给药。

[0014] 相对于天然存在的ActRIIa多肽,可溶性活化素结合ActRIIa多肽可以包括一个或多个氨基酸序列改变(例如在配体结合结构域)。改变的ActRIIa多肽的例子在WO 2006/012627,第59-60页中提供,通过参考纳入本文。氨基酸序列的改变可以例如当在哺乳动物、昆虫或其他真核细胞中生成时,改变多肽的糖基化,或者相对于天然存在的ActRIIa多肽改变多肽的蛋白酶裂解。

[0015] 活化素结合ActRIIa多肽可以是融合蛋白,其具有作为一个结构域的ActRIIa多肽(例如ActRIIa的配体结合部分)和一个或多个另外的提供所需特性如改善的药代动力学、更易纯化、靶向特定组织等的结构域。例如融合蛋白的结构域可以增强体内稳定性、体内半衰期、吸收/施用、组织定位或分布、蛋白质复合物的形成、融合蛋白的多聚化和/或纯化中的一种或多种。活化素结合ActRIIa融合蛋白可以包括免疫球蛋白Fc结构域(野生型或突变型)或血清白蛋白或其他提供所需特性,如改善的药代动力学、改善的可溶性或改善的稳定性多肽部分。在优选实施方案中,ActRIIa-Fc融合蛋白包含位于Fc结构域和胞外ActRIIa结构域之间的相对无特定结构的接头。此无特定结构的接头可以对应于ActRIIa胞外结构域C末端(所述“尾部”)的大致15个氨基酸无特定结构区,或者其可以是1、2、3、4或5个氨基酸,或5个与15、20、30、50个或更多氨基酸之间长度的相对无二级结构的人工序列,或两者的混合物。接头可以富含甘氨酸和脯氨酸残基,并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单序列或苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列(例如TG₄(SEQ ID NO:15)或SG₄(SEQ ID NO:16)单态或重复序列)。融合蛋白可以包括纯化子序列,如表位标记、FLAG标记、多聚组氨酸序列以及GST融合体。任选地,可溶性ActRIIa多肽包括一个或多个选自以下的修饰氨基酸残基:糖基化的氨基酸、PEG化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、缀合于脂质部分的氨基酸、缀合于有机衍生化剂的氨基酸。优选地,药物制剂基本上无热原。一般地,优选ActRIIa蛋白在哺乳动物细胞系中表达,所述细胞系适当地介导ActRIIa蛋白的天然糖基化,以消除患者的不利免疫反应的可能性。人和CHO细胞系已被成功使用,并且预计其他普通哺乳动物表达体系会有用。

[0016] 如本文所述,被称作ActRIIa-Fc的ActRIIa蛋白(该形式在ActRIIa部分和Fc部分之间具有很小的连接子)具有所需的特性,包括相对于GDF8和/或GDF11选择性结合于活化素,高亲和力配体结合以及动物模型中血清半衰期大于两周。在某些实施方案中,本发明提供使用ActRIIa-Fc多肽、以及包含这样的多肽和药学上可接受的赋形剂的药物制剂减少或抑制FSH分泌的方法。

[0017] 在某些方面,本公开提供了使周编码可溶性活化素结合ActRIIa多肽的核酸减少或抑制FSH分泌的方法。如上所述,分离的多核苷酸可以包含可溶性活化素结合ActRIIa多肽的编码序列。例如,如果没有位于跨膜结构域或胞浆结构域中的,或位于胞外结构域与跨

膜结构域或胞浆结构域之间的终止密码子,分离的核酸可以包括ActRIIa胞外结构域(例如配体结合结构域)的编码序列,以及将编码部分或全部ActRIIa跨膜结构域和/或胞浆结构域的序列。例如分离的多核苷酸可以包含全长ActRIIa多核苷酸序列,例如SEQ ID NO:4或5,或部分截短的形式,所述分离的多核苷酸进一步包含3'末端之前至少600个核苷酸的或其他位置的转录终止密码子,这样所述多核苷酸的翻译使得胞外结构域任选地融合到全长ActRIIa的截短部分。优选的核酸序列是SEQ ID NO:14。可用于本文所述方法中的核酸可操作地连接到用于表达的启动子,并且本文提供用这样的重组多核苷酸转化的细胞。优选地,所述细胞是哺乳动物细胞,如CHO细胞。

[0018] 本公开还提供制备可溶性活化素结合ActRIIa多肽的方法,所述多肽可用于减少或抑制FSH分泌。这样的方法可包括在合适的细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中,表达本文公开的任何核酸(如SEQ ID NO:4、5或14)。这样的方法可包括:a)在适于可溶性ActRIIa多肽表达的条件下培养细胞,其中所述细胞用可溶性ActRIIa表达构建物转化;以及b)回收这样表达的可溶性ActRIIa多肽。可溶性ActRIIa多肽可以以天然的、部分纯化的或高度纯化的组分回收。纯化可以通过一系列的纯化步骤完成,包括例如任何顺序的下述的一个、两个或三个或多个步骤:蛋白A层析、阴离子交换层析(例如Q琼脂糖)、疏水作用层析(例如苯基琼脂糖)、尺寸排阻层析和阳离子交换层析。

[0019] 在某些方面,本文公开的活化素ActRIIa拮抗剂,如可溶性活化素结合ActRIIa多肽,可用于在患者中减少或抑制FSH分泌的方法中,包括例如,延迟前列腺癌发生、抑制前列腺癌进展、减小肿瘤尺寸、阻止肿瘤生长、延迟转移发生或阻止转移的方法。在某些实施方案中,本公开提供在有此需要的患者中减少或抑制前列腺癌细胞生长或存活的方法。方法可包括将有效量的活化素ActRIIa拮抗剂给予有此需要的对象。在某些方面,如本文所述,本公开提供活化素-ActRIIa拮抗剂在制备用于治疗或预防前列腺癌的药物中的用途。本公开还涉及包含活化素-ActRIIa拮抗剂和放射疗法、化学疗法(例如细胞毒试剂)、和/或内分泌疗法的组合疗法。所述拮抗剂可以是ActRIIa-Fc融合蛋白,其中ActRIIa-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:3、6、7或13的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0020] 在其他实施方案中,本发明涉及在具有一种或多种前列腺癌风险因子的患者中阻止或延迟前列腺癌发生的方法。在一些实施方案中,本发明涉及在已诊断具有原发性前列腺肿瘤或具有前列腺增生性病变的患者中防止或延迟转移性疾病发生的方法。在人患者中防止或延迟前列腺癌发生的方法可包括给予有此需要的人患者有效量的选自下组的多肽:a)包含与SEQ ID NO:2至少90%相同的氨基酸序列的多肽;b)包含与SEQ ID NO:3至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和c)包含选自SEQ ID NO:2的至少50个连续氨基酸的多肽。

[0021] 本发明的其他实施方案涉及在患有前列腺癌的人患者中抑制活化素介导的信号转导的方法。某些实施方案中,所述方法包括给予人患者有效量的活化素-ActRIIa拮抗剂。在另外的实施方案中,所述拮抗剂是选自下组的多肽:a)包含与SEQ ID NO:2至少90%相同的氨基酸序列的多肽;b)包含与SEQ ID NO:3至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和c)包含选自SEQ ID NO:2的至少50个连续氨基酸的多肽。

[0022] 某些实施方案中,FSH分泌的减少或抑制导致生殖力的下降。在女性中,给予活化素-ActRIIa拮抗剂限制了卵泡粒膜细胞的增殖。在男性中,给予活化素-ActRIIa拮抗剂抑制精子成熟。在某些方面,本公开提供了用于避孕的方法和组合物。某些实施方案中,提供

了组合物,该组合物包含活化素-ActRIIa拮抗剂和一种或多种避孕剂诸如孕激素(progesterin)、黄体激素(progesterone)和雌激素。

[0023] 某些实施方案中,提供了在患有FSH-分泌型垂体瘤的患者中减少或抑制FSH分泌的方法;该方法包括给予活化素-ActRIIa拮抗剂。

[0024] 在某些方面,本公开提供了鉴定可抑制癌细胞(例如前列腺癌细胞)的生长或存活的方法。所述方法包括:a)鉴定结合于活化素或ActRIIa多肽的配体结合结构域的测试试剂;和b)评价所述试剂对癌细胞的增殖、存活或凋亡的作用。

附图说明

[0025] 图1显示CHO细胞中所表达的ActRIIa-hFc的纯化。该蛋白纯化为边界清晰的单峰形式。

[0026] 图2显示ActRIIa-hFc结合至活化素和GDF-11,通过BiaCore™分析测量。

[0027] 图3显示了A-204报告基因检测的示意图。该图显示了报告载体:pGL3(CAGA)12(在Dennler et al,1998,EMBO 17:3091-3100中有描述)。CAGA12基序出现在TGF-β反应性基因(PAI-1基因)中,因此该载体可通用于通过Smad 2和3的因子信号传导。

[0028] 图4显示了A-204报告基因分析中ActRIIa-hFc(菱形)和ActRIIa-mFc(正方形)对GDF-8信号传导的作用。两种蛋白都显示出在皮摩尔浓度基本上抑制GDF-8介导的信号传导。

[0029] 图5显示了A-204报告基因分析中三种不同的ActRIIa-hFc制剂对GDF-11信号传导的作用。

[0030] 图6显示了12周治疗期之前(上图)和之后(底图),对照和ActRIIa-mFc治疗的BALB/c小鼠的DEXA图像的示例。更浅色度显示了增加的骨密度。

[0031] 图7显示了12周期间,ActRIIa-mFc对BALB/c小鼠骨矿密度作用的定量。治疗分为对照(菱形)、2mg/kg剂量ActRIIa-mFc(正方形)、6mg/kg剂量ActRIIa-mFc(三角形)以及10mg/kg剂量ActRIIa-mFc(圆圈)。

[0032] 图8显示了12周期间,ActRIIa-mFc对BALB/c小鼠骨矿含量作用的定量。治疗分为对照(菱形)、2mg/kg剂量ActRIIa-mFc(正方形)、6mg/kg剂量ActRIIa-mFc(三角形)以及10mg/kg剂量ActRIIa-mFc(圆圈)。

[0033] 图9显示了经过6周后,ActRIIa-mFc对切除卵巢(OVX)或假手术(SHAM)C57BL6小鼠小梁骨的骨矿密度作用的定量。治疗分为对照(PBS)或10mg/kg剂量ActRIIa-mFc(ActRIIa)。

[0034] 图10显示了经过12周,ActRIIa-mFc对切除卵巢(OVX)C57BL6小鼠小梁骨的作用的定量。治疗分为对照(PBS,浅色棒形图)或10mg/kg剂量ActRIIa-mFc(ActRIIa,深色棒形图)。

[0035] 图11显示了6周或12周治疗期后,ActRIIa-mFc对假手术C57BL6小鼠小梁骨作用的定量。治疗分为对照(PBS,浅色棒形图)或10mg/kg剂量ActRIIa-mFc(ActRIIa,深色棒形图)。

[0036] 图12显示了经过12周治疗,切除卵巢小鼠骨密度的pQCT分析结果。治疗分为对照(PBS,浅色棒形图)或ActRIIa-mFc(深色棒形图)。Y轴:mg/ccm

[0037] 图13描述了经过12周治疗,假手术小鼠骨密度的pQCT分析结果。治疗分为对照(PBS,浅色棒形图)或ActRIIa-mFc(深色棒形图)。Y轴:mg/ccm

[0038] 图14A和14B显示了(A)12周治疗之后整体DEXA分析和(B)股骨离体(ex vivo)分析。亮区描述了高骨密度的区域。

[0039] 图15显示了12周治疗之后,股骨中段的离体pQCT分析。治疗分为媒介对照(PBS,深色棒形图)和ActRIIa-mFc(浅色棒形图)。左侧的四个棒形图显示总骨密度,而右侧的四个棒形图显示皮质骨密度。每组四个棒形图的第一对表示来自切除卵巢小鼠的数据,而第二对棒形图表示来自假手术小鼠的数据。

[0040] 图16显示了12周治疗之后,股骨中段的离体pQCT分析和骨干骨含量。治疗分为媒介对照(PBS,深色棒形图)或ActRIIa-mFc(浅色棒形图)。左侧的四个棒形图显示总骨含量,而右侧的四个棒形图显示皮质骨含量。每组四个棒形图的第一对表示来自切除卵巢小鼠的数据,第二对棒形图表示来自假手术小鼠的数据。

[0041] 图17显示了股骨中段和股骨皮质厚度的离体pQCT分析。治疗分为媒介对照(PBS,深色棒形图)和ActRIIa-mFc(浅色棒形图)。左侧的四个棒形图显示骨内膜周长(endosteal circumference),而右侧的四个棒形图显示骨外膜周长(periosteal circumference)。每组四个棒形图的第一对表示来自切除卵巢小鼠的数据,第二对棒形图表示来自假手术小鼠的数据。

[0042] 图18描述了治疗12周后股骨力学测试结果。治疗分为对照(PBS,深色棒形图)和ActRIIa-mFc(浅色棒形图)。左侧的两个棒形图代表来自切除卵巢小鼠的数据,而后面两个棒形图代表来自假手术小鼠的数据。

[0043] 图19显示了ActRIIa-mFc对小梁骨体积的作用。

[0044] 图20显示了ActRIIa-mFc对股骨远端的骨小梁结构的作用。

[0045] 图21显示了ActRIIa-mFc对皮质骨的作用。

[0046] 图22显示了ActRIIa-mFc对骨骼机械强度的作用。

[0047] 图23显示了在三个不同剂量下,不同剂量的ActRIIa-mFc对骨骼特性的影响。

[0048] 图24显示了骨组织形态学测量,表明ActRIIa-mFc具有合成代谢和抗吸收的双重活性。

[0049] 图25显示另外的组织形态学测量数据。

[0050] 图26显示首次接受试验的和携带肿瘤小鼠的小鼠股骨图像,以及ActRIIa-mFc治疗对多发性骨髓瘤模型中骨形态的影响。携带多发性骨髓瘤(5T2)的小鼠相对于正常小鼠(首次接受试验的),表现出骨骼明显的点蚀和降解。用ActRIIa-mFc治疗消除了这种作用。

[0051] 图27显示实施例5所述的人临床试验结果,其中无论ActRIIa-hFc是静脉注射(IV)或皮下注射(SC)给药,曲线下面积(AUC)都与ActRIIa-hFc的给药剂量线性相关。

[0052] 图28显示患者IV或SC给药后,ActRIIa-hFc的血清水平比较。

[0053] 图29显示响应不同剂量水平ActRIIa-hFc的骨碱性磷酸酶(BAP)水平。BAP是合成代谢骨骼生长的标志。

[0054] 图30显示ActRIIa-mFc(RAP-011)和双膦酸盐药物(唑来磷酸)对小鼠的协同效应。

[0055] 图31显示实施例6中所述的人临床试验的结果,说明ActRIIa-hFc以时间-和剂量依赖性方式降低了FSH水平。

[0056] 图32显示对ActRIIa-hFc剂量的AUC分析,所述剂量实现了对FSH水平的各种程度的作用。

具体实施方式

[0057] 1. 综述

[0058] 转化生长因子 β (TGF- β) 超家族包含多种具有相同共有序列元件和结构基序的生长因子。已知这些蛋白对脊椎动物和无脊椎动物的许多细胞类型产生生物学作用。该超家族的成员在胚胎发育过程中,在模式形成以及组织特化中执行重要功能,并能影响多种分化进程,包括脂肪生成、肌生成、软骨形成、心脏发生、造血、神经生成以及上皮细胞分化。该家族分为两大分支:BMP/GDF和TGF- β /活化素分支,其成员有不同的,通常是互补的作用。通过利用TGF- β 家族成员的活性,通常可能导致生物体内重要的生理学变化。例如,皮尔蒙特(Piedmontese)和比利时蓝(Belgian Blue)牛品种带有使肌肉质量明显增加的GDF8(也称为肌肉生长抑制素(myostatin))基因内功能丢失的突变。Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17 (1): 71-4。此外,人体中GDF8的非活性等位基因与肌肉质量的增加,以及据称异常强度相关。Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8。

[0059] 活化素是属于TGF- β 超家族的二聚体多肽生长因子。有三种主要的活化素形式(A、B和AB),它们是两个密切相关的 β 亚单位(分别是 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)的同源/异源二聚体。人类基因组也编码主要在肝脏中表达的活化素C和活化素E,还已知含有 β_C 或 β_E 的异源二聚体形式。在TGF- β 超家族中,活化素是可以刺激卵巢内以及胎盘细胞中激素的产生,帮助神经细胞存活,取决于细胞类型正性或或负性地影响细胞周期进程,以及至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层分化的独特和多功能的因子(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198: 500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963)。在几种组织中,活化素信号传导被其相关的异源二聚体抑制素所拮抗。例如在垂体释放促卵泡素(FSH)时,活化素促进FSH分泌与合成,而抑制素阻止FSH分泌与合成。其他的可调节活化素生物活性和/或与活化素结合的蛋白包括卵泡抑制素(FS)、卵泡抑制素相关蛋白(FSRP)和 α_2 -巨球蛋白。

[0060] TGF- β 信号通过I和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合体介导,其通过配体刺激而磷酸化并激活下游Smad蛋白(Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178)。这些I型和II型受体是跨膜蛋白,由带有富含半胱氨酸区的配体结合胞外结构域、跨膜结构域和带有预期丝氨酸/苏氨酸特异性的细胞质结构域组成。I型受体是信号传导所必须的;II型受体是结合配体以及表达I型受体所需的。I型和II型活化素受体在配体结合后形成稳定的复合物,使I型受体被II型受体磷酸化。

[0061] 两种相关的II型受体ActRIIa和ActRIIb已被鉴定为活化素的II型受体(Mathews and Vale, 1991, Cell 65: 973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108)。除活化素外,ActRIIa和ActRIIb可以与其他几种TGF- β 家族蛋白,包括BMP7、Nodal、GDF8和GDF11发生生化相互作用(Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130: 217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16: 2749-54)。ALK4是主要的活化素,特别是活化素A的I型受体,ALK-7同样也可以作为活化素,特别是活化素B的受体。

[0062] 如本文所描述的,可溶性ActRIIa多肽(sActRIIa)显示出显著优先结合于活化素A(相对于其他TGF- β 家族成员如GDF8或GDF11),这种可溶性ActRIIa多肽可用于减少或抑制FSH分泌。然而不希望受限于任何特定的机制,考虑到通过这些研究中采用的特定sActRIIa构建物所展现的非常强的活化素结合(皮摩尔浓度的(pM)解离常数),预期sActRIIa的作用主要是由活化素拮抗剂作用引起的。活化素-ActRIIa拮抗剂包括例如活化素结合可溶性ActRIIa多肽,结合至活化素(特别是活化素A或B亚单位,也称为 β A或 β B)并中断ActRIIa结合的抗体,结合至ActRIIa并中断活化素结合的抗体,选用于活化素或ActRIIa结合的非抗体蛋白(参见例如WO/2002/088171、WO/2006/055689和WO/2002/032925中的这类蛋白的例子,及其设计和选择方法),以及选用于活化素或ActRIIa结合的通常缀合到Fc结构域的随机肽。两种具有活化素或ActRIIa结合活性的不同蛋白(或其他部分),特别是分别阻断I型(例如可溶性I型活化素受体)或II型(例如可溶性II型活化素受体)结合位点的活化素结合物,可以连接在一起以产生双功能性结合分子。核酸适配体、小分子和其他物质抑制活化素-ActRIIa信号传导轴。各种蛋白具有活化素-ActRIIa拮抗剂活性,包括抑制素(即抑制素 α 亚单元,尽管抑制素并不在所有组织中普遍拮抗活化素)、卵泡抑制素(如卵泡抑制素-288和卵泡抑制素-315)、FSRP、活化素C、 α (2)-巨球蛋白,以及M108A(在位置108由甲硫蛋白变为丙氨酸)突变体活化素A。通常活化素的替代形式,特别是I型受体结合结构域有变化的那些可以结合至II型受体,并且不能形成活性三元复合物,因而作为拮抗剂起作用。另外,抑制活化素A、B、C或E、或尤其ActRIIa表达的核酸例如反义分子、siRNAs或核酶,可以用作活化素-ActRIIa拮抗剂。所采用的活化素-ActRIIa拮抗剂可显示相对于TGF- β 家族的其他成员,尤其相对于GDF8和GDF11的抑制活化素介导的信号传导的选择性。可溶性ActRIIb蛋白确实结合至活化素,然而野生型蛋白并不显示相对于GDF8/11的结合至活化素的明显选择性。然而,这些ActRIIb多肽以及具有不同的结合特性的ActRIIb的改变形式(参见例如WO 2006/012627,第55-59页,通过参考纳入本文)可能实现对癌细胞的所需效果。天然的或改变的ActRIIb可以通过偶联第二活化素选择性结合物质,而得到对活化素的更多的特异性。

[0063] 本说明书所用的术语在本领域、本发明的上下文以及每个术语使用的特定语境中,通常有其一般的意思。某些术语在下文或本说明书中其他地方讨论,用以在描述本发明的组合物和方法以及怎样制备和使用它们的方法中,向专业人员提供额外的指导。术语的任何应用范围或含义在其所使用的特定语境中是显而易见的。

[0064] “约”和“大约”通常意味着考虑到测量的性质和精度时测量量的可接受误差程度。通常,典型的误差程度在给定数值或数值范围的20%以内,优选10%以内,更优选5%以内。

[0065] 或者并且尤其地在生物学体系中,术语“大约”以及“约”可能意味着数量级范围内的值,优选给定值的5倍以内,更优选2倍以内。除非另有说明,本文给定的数量是近似的,这意味着未特意说明时,术语“大约”或“约”可以推断。

[0066] 本发明的方法可以包括比较相互间序列的步骤,包括野生型的序列与一个或多个突变体(序列变体)的比较。这样的比较通常包括多聚物序列的比对,例如使用本领域公知的序列比对程序和/或算法(例如BLAST、FASTA和MEGALIGN,仅举几例)。本领域熟练技术人员容易意识到,在突变含有残基插入或缺失的这种比对中,序列比对将在不包含所述插入或缺失残基的多聚物序列中引入“空位”(通常以破折号或“A”表示)。

[0067] “同源性”,所有其语法形式和拼写变化指的是具有“共同进化起源”的两种蛋白之

间的关系,包括同种生物体的超家族蛋白,以及不同种生物体的同源蛋白。如其序列相似性所反映的,无论从相同性百分比或通过特定残基或基序和保守位点的存在,这样的蛋白(及其编码核酸)都具有序列同源性。

[0068] 术语“序列相似性”,其所有的语法形式指的是可能有或可能没有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的相同性或相对应的程度。

[0069] 然而,在常见用法和本申请中,当被如“高度”这样的副词修饰时,术语“同源的”可指序列相似性,并且可能或可能不涉及共同进化起源。

[0070] 术语“前列腺癌”指前列腺的任何增生性病变或增生性异常,包括例如良性病变、恶变前和恶性病变、实体瘤和转移性疾病(局部转移例如III期,和更广泛的转移例如IV期)。前列腺癌还涵盖激素响应性和非激素依赖性癌症。激素不应性前列腺癌对用抗激素(尤其是抗雌激素)疗法进行的治疗不响应(refractory)。

[0071] 2. ActRIIa多肽

[0072] 在某些方面,本发明涉及ActRIIa多肽。如本发明所用的术语“ActRIIa”指任何形式的活化素受体IIa型(ActRIIa)蛋白家族,以及通过突变或其他修饰源自这样的ActRIIa蛋白的变体。本文所指ActRIIa可以理解为指任何一种目前已鉴定的形式。ActRIIa家族成员通常是跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸区的配体结合胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域组成。

[0073] 术语“ActRIIa多肽”包括包含任何天然生成的ActRIIa家族成员的多肽及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合体和拟肽类形式)的多肽。例如,ActRIIa多肽包括来自与ActRIIa多肽序列具有至少约80%相同性的序列的任何已知ActRIIa序列的多肽,优选至少85%、90%、95%、97%、99%或更高相同性。例如,本发明的ActRIIa多肽可以结合至并抑制ActRIIa蛋白和/或活化素的功能。优选地,ActRIIa多肽在体内或用垂体细胞进行的体外测定中降低FSH水平。ActRIIa多肽的例子包括人ActRIIa前体多肽(SEQ ID NO: 1)以及可溶性人ActRIIa多肽(例如SEQ ID NOs:2、3、7和12)。

[0074] 人ActRIIa前体蛋白序列如下:

MGAAAKLAFAVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGV
EPCYGDKDKRRHCFATWKNI**SGSIEIVKQGCW**LDDINCYDRTDCVEK
KDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILL
 YSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLG
 LKPLQLLEVKARGREFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEV
 YSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLI TAFHEKGSLSDFLKAN
 [0075] VVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVL
 LKNNLTACIADFGALALKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAIN
 FQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHP
 SLEDMQEVVVHKKKR PVL RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARL
 SAGCVGERITQMQRILTNIITTEDIVTVVVTMVTNVDFPPKESSL
 (SEQ ID NO: 1)

[0076] 信号肽加单下划线标示;胞外结构域以粗体标示,并且可能的N-连接糖基化位点

加双下划线标示。

[0077] 人ActRIIa可溶的(胞外)、加工的多肽序列如下:

[0078]

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNI SG SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDS
PEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO:2)

[0079] 胞外结构域的C-末端“尾部”加下划线标示。“尾部”缺失(Δ 15序列)的序列如下:

[0080]

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNI SG SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDS
PEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO:3)

[0081] 编码人ActRIIa前体蛋白的核酸序列如下(Genbank登录号NM_001616的核苷酸164-1705):

[0082]

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGA
AACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATG
GTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGT
TGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTG
TTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATC
CAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAACATCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTC
ATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGACCCAGGACC
ACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTG
TCTGGAAAGCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAAATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAAT
GAATACGAAGTCTACAGTTTGCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCAC
CAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATG
TGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCT
GGCCTAAAAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCT
GACAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGG
TTGGTACCCGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACTTCAAAGGGATGCATTTTGGAGGATA
GATATGTATGCCATGGGATTAGTCCATATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATA
CATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTTGGCCAGCATCCATCTCTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAA
AGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGG
GATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATAT
TATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATcTAGTcTAT
GA (SEQ ID NO:4)

[0083] 编码人ActRIIa可溶性(胞外)多肽的核酸序列如下:

[0084]

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGG
TGTTGAACCGTGTATATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTG
AAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTCGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGC
CCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCAC

ACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID NO:5)

[0085] 在特定实施方案中,本发明涉及可溶性ActRIIa多肽及其在降低FSH水平中的用途。如本文所述,术语“可溶性ActRIIa多肽”通常指包含ActRIIa蛋白胞外结构域的多肽。本文所用的术语“可溶性ActRIIa多肽”包括ActRIIa蛋白的任何天然存在的胞外结构域及其任意变体(包括突变体、片段和拟肽类形式)。活化素结合ActRIIa多肽是保留结合至活化素,特别是活化素AA、AB或BB的能力的多肽。优选地,活化素结合ActRIIa多肽以1nM或更低的解离常数结合至活化素AA。下面提供人ActRIIa前体蛋白的氨基酸序列。ActRIIa蛋白的胞外结构域结合至活化素,并且通常是可溶的,因而可称为可溶性活化素结合ActRIIa多肽。可溶性的活化素结合ActRIIa多肽的例子包括SEQ ID NOs:2、3、7、12和13说明的可溶性多肽。SEQ ID NO:7被称作ActRIIa-hFc,并在实施例中进行进一步说明。其他的可溶性活化素结合ActRIIa多肽包括除ActRIIa蛋白胞外结构域之外的信号序列,例如蜜蜂蜂毒肽前导序列(SEQ ID NO:8)、组织纤溶酶原激活剂(TPA)前导序列(SEQ ID NO:9)或者天然ActRIIa前导序列(SEQ ID NO:10)。SEQ ID NO:13说明的ActRIIa-hFc多肽使用TPA前导序列。

[0086] ActRIIa多肽的功能活性片段可以通过筛选由编码ActRIIa多肽的相应核酸片段重组制备的多肽获得。另外,片段可以使用本领域已知的例如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学技术进行化学合成。可以制备(重组或化学合成)并检测所述片段,以鉴别那些能作为ActRIIa蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂(抑制剂)而起作用的肽基片段。

[0087] ActRIIa多肽的功能活性变体可以通过筛选从编码ActRIIa多肽的相应诱变核酸重组生成的修饰多肽的文库获得。可以制备并检测所述变体,以鉴别能作为ActRIIa蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂(抑制剂)而起作用的那些。在某些实施方案中,ActRIIa多肽的功能性变体包括与选自SEQ ID NOs:2或3的氨基酸序列具有至少75%相同性的氨基酸序列。在某些例子中,所述功能性变体与选自SEQ ID NOs:2或3的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0088] 功能性变体可以通过为诸如增强治疗功效或稳定性(例如离体保存期限以及体内抗蛋白降解)目的,修饰ActRIIa多肽的结构而生成。这样修饰的ActRIIa多肽当被选择保留活化素结合时,被认为是天然存在的ActRIIa多肽的功能性等同物。修饰的ActRIIa多肽也可以例如通过氨基酸取代、缺失或添加制备。例如,可以合理预测,以异亮氨酸或缬氨酸单独取代亮氨酸,以谷氨酸单独取代天冬氨酸,以丝氨酸单独取代苏氨酸,或者以结构相关的氨基酸类似取代氨基酸(例如保守突变)不会对产生的分子的生物学活性有大的影响。保守取代是那些在其侧链相关的氨基酸家族中发生的取代。ActRIIa多肽氨基酸序列的变化是否产生功能同源物,可以容易地通过评估变体ActRIIa多肽以类似于野生型ActRIIa多肽的方式在细胞内产生应答的能力来确定。

[0089] 在某些实施方案中,本发明考虑了ActRIIa多肽的特定突变,以改变该多肽的糖基化。可选择这样的突变,以便引入或消除一个或多个糖基化位点,例如O-连接或N-连接糖基化位点。天冬酰胺连接的糖基化识别位点通常包括被适当的细胞糖基化酶特异识别的三肽序列,天冬酰胺-X-苏氨酸(或天冬酰胺-X-丝氨酸)(这里的“X”是任何氨基酸)。所述改变也可以通过向野生型ActRIIa多肽(对于O-连接的糖基化位点)添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代野生型ActRIIa多肽(对于O-连接的糖基化位点)进行。在糖基化识别位点的第一个或第三个氨基酸位点之一或两者上的各种氨基

酸取代或缺失(和/或在第二个位点上的氨基酸缺失)导致在修饰的三肽序列的非糖基化。另一增加ActRIIa多肽上糖类部分数量的方法是通过化学或酶偶合糖苷至ActRIIa多肽。依赖于所采用的偶合方式,所述糖可连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基基团;(c)游离巯基基团,如半胱氨酸的游离巯基;(d)游离羟基,如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基;(e)芳香残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法在1987年9月11号公开的W0 87/05330以及Aplin和Wriston(1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306中有描述,通过参考纳入本文。可通过化学和/或酶学的方法完成去除ActRIIa多肽上的一个或多个糖类部分。化学去糖基化可涉及例如ActRIIa多肽接触化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除了连接糖(N-乙酰基葡萄糖或N-乙酰基半乳糖胺)之外的大部分或所有糖的断裂,而同时保持氨基酸序列的完整。化学去糖基化在Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 and by Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.* 118:131中有进一步的描述。ActRIIa多肽糖部分的酶切可通过使用Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350所述的各种内切糖苷酶或外切糖苷酶实现。由于哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞都可以引入可被所述肽的氨基酸序列影响的不同糖基化模式,所以ActRIIa多肽的序列可以随使用的表达体系酌情改变。通常情况下,尽管预期其他的哺乳动物表达细胞系、具有基因工程糖基化酶的酵母细胞系和昆虫细胞也是有用的,但用于人类的ActRIIa多肽将在提供正确糖基化的哺乳动物细胞系如HEK293细胞或CHO细胞系中表达。

[0090] 本公开进一步考虑了生成突变体,尤其是ActRIIa多肽的成套组合突变体以及截短突变体的方法;组合突变体的库对于鉴别功能性变体的序列特别有用。筛选这样组合文库的目的可能在于生成例如可作为激动剂或拮抗剂起作用,或者具有所有新活性的ActRIIa多肽变体。各种筛选分析在下文提供,并且这样的方法可用于评估变体。例如可筛选ActRIIa多肽变体是否有结合至ActRIIa配体,防止ActRIIa配体结合至ActRII多肽,或干扰ActRIIa配体引起的信号传导的能力。

[0091] ActRIIa多肽或其变体的活性也可以在基于细胞的测定或体内测定中进行检测。例如ActRIIa多肽变体对涉及FSH生成的基因表达的作用。如果需要,这可以在一个或多个重组ActRIIa配体蛋白(例如活化素)存在下进行,可转染细胞以生成ActRIIa多肽和/或其变体,以及任选的ActRIIa配体。同样地,ActRIIa多肽可以给予小鼠或其他动物,并评估FSH水平。可产生FSH的垂体细胞系是公知的,可测试ActRIIa蛋白在减少FSH产生(尤其是在外源提供的活化素存在下)中的效力。另一个例子,可评估ActRIIa多肽变体对癌细胞增殖或存活的作用。癌细胞可指活对象中构成了实体瘤的细胞,或指起源于肿瘤并扩散到活对象中其他位置的细胞(即,转移细胞)。此外,癌细胞还指获得自或衍生自肿瘤或癌性生长物并经体外培养的细胞。癌细胞还涵盖了例如可体外培养或用于动物异种移植物研究中的细胞系。癌细胞还指在(癌)转移后通过细胞分裂衍生自转移细胞的细胞。这些细胞可以是激素响应性的或非激素依赖性的。可在一种或多种重组ActRIIa配体蛋白(例如活化素)存在下评估癌细胞增殖或存活,可转染细胞以产生ActRIIa多肽和/或其变体,以及任选地,ActRIIa配体。同样,可将ActRIIa多肽给予小鼠或其他动物,可评估一种或多种检测(指标),例如肿瘤大小或相对于对照的细胞增殖或凋亡速率。

[0092] 可生成相对于天然存在的ActRIIa多肽,具有选择性或通常增加的效价的组合来

源的变体。同样地,突变可以导致比起相应野生型ActRIIa多肽,具有显著不同细胞内半衰期的变体。例如可以使改变的蛋白对蛋白水解或其他导致天然ActRIIa多肽被破坏或失活的细胞过程更稳定或者更不稳定。这样的变体以及编码它们的基因可通过调节ActRIIa多肽的半衰期,用于改变ActRIIa多肽水平。例如,短的半衰期可以导致更多的短暂生物学效应,并可更紧密地控制患者体内的重组ActRIIa多肽的水平。在Fc融合蛋白中,可以在接头(如果有的话)和/或Fc部分进行突变,从而改变所述蛋白的半衰期。

[0093] 组合文库可以通过编码每个包括至少部分可能的ActRIIa多肽序列的多肽文库的简并基因文库制备。例如合成寡核苷酸的混合物可以酶促连接入基因序列,这样一组简并形式的可能ActRIIa多肽核苷酸序列可表达为单独的多肽,或表达为一组更大的融合蛋白(例如噬菌体展示的融合蛋白)。

[0094] 有很多种可从简并寡核苷酸序列生成可能同源物文库的方法。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,合成的基因随后被连接到合适的载体进行表达。简并寡核苷酸的合成在本领域是公知的(参见例如Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。这样的技术已经在其他蛋白的定向进化中被采用(参见例如Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; 以及U.S. 专利号:5,223,409、5,198,346和5,096,815)。

[0095] 或者,其他形式的突变可用于生成组合文库。例如ActRIIa多肽变体可以通过使用例如丙氨酸筛选突变等等的筛选(Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 和 Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), 通过接头扫描诱变(Gustin et al., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) *Science* 232:316); 通过饱和诱变(Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); 通过PCR诱变(Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); 或通过随机诱变,包括化学诱变等等(Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 以及Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34), 从文库生成并分离。接头扫描诱变,特别是在组合设定中,是有吸引力的鉴别截短(生物活性)形式ActRIIa多肽的方法。

[0096] 在本领域中,筛选通过点突变和截短得到的组合文库的基因产物,以及就此而言,筛选cDNA文库得到具有某种特性基因产物的大量技术是公知的。对于快速筛选通过ActRIIa多肽的组合突变产生的基因文库,这样的技术一般是适用的。最广泛地用于筛选大基因文库的技术通常包括将所述基因文库克隆到可复制的表达载体中,用获得的载体文库转化合适的细胞,并在其中检测所需活性有利于相对容易分离编码其产物被检测的基因的载体的条件下表达组合基因。优选的检测包括活化素结合分析和活化素介导的细胞信号传

导分析。

[0097] 在某些实施方案中,除了ActRIIa多肽中天然存在的任何修饰,本发明的ActRIIa多肽可以进一步包括翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化以及酰基化。结果,修饰后的ActRIIa多肽可含有非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸。这样的非氨基酸元件对ActRIIa多肽功能性的作用可如本文所述对其他ActRIIa多肽变体进行检测。当ActRIIa多肽通过剪切ActRIIa多肽的新生形式在细胞内生成时,翻译后加工对蛋白正确折叠和/或功能可能也是重要的。不同细胞(例如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)对于这样的翻译后活性有特定细胞机制和特有机理,可选用以确保ActRIIa多肽的正确修饰和加工。

[0098] 在某些方面,ActRIIa多肽的功能性变体或修饰形式包括具有至少部分ActRIIa多肽和一个或多个融合结构域的融合蛋白。公知的这样的融合结构域的例子包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、A蛋白、G蛋白、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域,以赋予所需性质。例如一些融合结构域对于通过亲和层析分离融合蛋白尤其有用。为亲和纯化的目的,采用亲和层析相关的基质如谷胱甘肽-、淀粉酶-以及镍-或钴缀合的树脂。许多这样的基质可以以“试剂盒”的形式获得,如Pharmacia的GST纯化体系以及使用(HIS₆)融合伴侣的QIAexpress™体系(Qiagen)。作为另外的例子,可以选择融合结构域,以有助于ActRIIa多肽的检测。这样的检测结构域的例子包括各种荧光蛋白(如GFP)以及“表位标记”,其通常是可获得其特异性抗体的短肽序列。公知的容易得到其特异单克隆抗体的表位标记包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)以及c-myc标记。在一些实例中,融合结构域具有诸如Xa因子或凝血酶的蛋白酶切位点,其允许相关的蛋白酶部分消化融合蛋白,从而从中释放重组蛋白。然后释放的蛋白可通过随后的层析分离从融合结构域中分离。在某些优选的实施方案中,ActRIIa多肽与体内稳定ActRIIa多肽的结构域(“稳定剂”结构域)融合。“稳定”指增加血清半衰期的任何事务,而不考虑其是否由减少破坏、降低肾清除率或其他药物代谢动力学作用引起。已知与免疫球蛋白Fc部分的融合可赋予多种多样的蛋白所需药物代谢动力学性质。同样地,与人血清白蛋白融合可赋予所需性质。可选择的其他类型的融合结构域包括多聚(例如二聚、四聚)结构域以及功能性结构域(根据需要,其赋予另外的生物学功能,例如进一步刺激骨骼生长或肌肉生长)。

[0099] 作为特定的例子,本发明提供了包含融合于Fc结构域的ActRIIa可溶性胞外结构域的融合蛋白(例如SEQ ID NO:6)。

[0100] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)
 VSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)
 VSNKALPVPYEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

[0101] 任选地,Fc结构域在例如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434的残基有一个或多个突变。在某些例子中,具有一个或多个这些突变(例如Asp-265突变)的突变体Fc结构域相对于野生型Fc结构域,结合至Fc γ 受体的能力降低。在其他的例子中,具有一个或多个这些突变(例如Asn-434突变)的突变体Fc结构域相对于野生型Fc结构域,结合至MHC I类相关Fc受体(FcRN)的能力提高。

[0102] 可以理解,融合蛋白的不同元件可以以任何与所需功能性相一致的方式排列。例如,ActRIIa多肽可置于异源结构域的C末端,或者异源结构域可置于ActRIIa多肽的C末端。ActRIIa多肽结构域和所述异源结构域无需在融合蛋白中相邻,并且另外的结构域或氨基酸序列可以包括在两个结构域任一个的C末端或N末端或两个结构域之间。

[0103] 在某些实施方案中,本发明的ActRIIa多肽含有一个或多个可以稳定ActRIIa多肽的修饰。例如这样的修饰增强ActRIIa多肽的体内半衰期,增强ActRIIa多肽的循环半衰期或减少ActRIIa多肽的蛋白降解。这样的稳定修饰包括但不限于融合蛋白(包括例如包含ActRIIa多肽和稳定剂结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括例如糖基化位点添加至ActRIIa多肽)以及糖部分的修饰(包括例如从ActRIIa多肽去除糖部分)。就融合蛋白而言,ActRIIa多肽融合至如IgG分子的稳定剂结构域(如Fc结构域)。如同本文所使用的,术语“稳定剂结构域”不仅指提到的融合蛋白中的融合结构域(例如Fc),而且包括如糖部分的非蛋白质类修饰,或如聚乙二醇的非蛋白质类聚合物。

[0104] 在某些实施方案中,本发明可获得分离和/或纯化形式的从其他蛋白分离或基本上没有其他蛋白的ActRIIa多肽。ActRIIa多肽通常通过重组核酸表达而产生。

[0105] 3. 编码ActRIIa多肽的核酸

[0106] 在某些方面,本发明提供了分离的和/或重组的编码任何ActRIIa多肽(例如可溶性ActRIIa多肽)的核酸,包括本文公开的片段、功能性变体和融合蛋白,本发明还公开了核酸产生可用于减少FSH水平的蛋白的用途。例如SEQ ID NO:4编码天然存在的人ActRIIa前体多肽,而SEQ ID NO:5编码加工的ActRIIa胞外结构域。目标核酸可以是单链的或双链的。这样的核酸可以是DNA分子或RNA分子。这些核酸可以用于例如制备ActRIIa多肽的方法,或用作直接治疗剂(例如在基因治疗方法中)。

[0107] 在某些方面,编码ActRIIa多肽的目标核酸进一步理解为包括是SEQ ID NO:4或5的变体的核酸。变体核苷酸序列包括不同之处在于一个或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列,如等位基因变体。

[0108] 在某些实施方案中,本发明提供了分离或重组的与SEQ ID NO:4或5具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%相同性的核酸序列的用途。本领域普通技术人员会理解,与SEQ ID NO:4或5,以及与SEQ ID NO:4或5的变体互补的核酸序列也包括在本发明的范围内。在进一步的实施方案中,本发明的核酸可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合的,或DNA文库中的。

[0109] 在其他的实施方案中,用于降低FSH水平的蛋白由核酸编码,所述核酸在高严谨性条件下与SEQ ID NO:4或5中指定核苷酸序列、SEQ ID NO:4或5的互补序列或其片段的核苷酸序列杂交。如上所讨论的,本领域普通技术人员容易理解,促进DNA杂交的适宜严谨性条件可以改变。例如可以约45°C下,在6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中进行杂交,随后50°C下,以2.0 x SSC洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可以选自50°C下,约2.0 x SSC的低严谨性条件至50°C下,约0.2 x SSC的高严谨性条件。另外,洗涤步骤的温度可以从约22°C室温的低严谨性条件至约65°C的高严谨性条件。温度和盐都可以变化,或者温度或者盐浓度可在另一个变量改变时保持恒定。在一个实施方案中,本发明提供了在室温下以6 x SSC的低严谨性条件下杂交,随后在室温下以2 x SSC洗涤的核酸。

[0110] 由于遗传密码子的简并性,与SEQ ID NOs:4或5中所列核酸不同的分离核酸也包

括在本发明的范围内。例如大量的氨基酸被不止一个三联体指定。指定相同氨基酸的密码子或同义密码子(例如对于组氨酸,CAU和CAC是同义的)可以导致不影响蛋白氨基酸序列的“沉默”突变。然而,预期导致目标蛋白氨基酸序列变化的DNA序列多态性会存在于哺乳动物细胞中。本领域技术人员应当了解,由于天然等位基因变异,编码特定蛋白的核酸的一个或多个核苷酸(至多约3-5%的核苷酸)的这些变异可以存在于给定种的个体中。任意或全部这样的核苷酸变异以及得到的氨基酸多态性在本发明的范围内。

[0111] 在某些实施方案中,本发明的重组核酸可操作地连接到表达构建物的一个或多个调节核苷酸序列上。调节核苷酸序列通常适合用于表达的宿主细胞。本领域公知多种宿主细胞的许多类型的合适表达载体和适宜调节序列。通常所述一个或多个调节核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子序列。本领域已知的组成型的或诱导启动子被本发明所涵盖。启动子可以是天然存在的启动子,也可以是组合超过一个启动子元件的杂合启动子。表达构建物可存在于细胞内的游离体如质粒上,或表达构建物插入染色体内。在优选实施方案中,表达载体含有选择性标记基因以供筛选转化的宿主细胞。选择性标记基因是本领域公知的,并且会随采用的宿主细胞而变化。

[0112] 在本发明的某些方面,目标核酸在包含编码ActRIIa多肽的核苷酸序列的表达载体中提供,并可操作地连接至至少一个调节序列。调节序列是本领域公认的,被选择来引导ActRIIa多肽的表达。相应地,术语调节序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示范性的调节序列在Gocddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中描述。例如,当可操作地连接到DNA序列时,控制DNA序列表达的任意各种表达调控序列可用于这些载体,以表达编码ActRIIa多肽的DNA序列。这样有用的表达调控序列包括例如SV40的早期或晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、由T7 RNA聚合酶引导表达的T7启动子、噬菌体λ的主要操作基因和启动子区、fd衣壳蛋白的调控区、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子例如Pho5、酵母α-交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子,以及其他已知调控原核细胞或真核细胞或其病毒基因表达的序列,及其各种组合。应当理解,表达载体的设计可能取决于待转化的宿主细胞和/或想表达的蛋白类型的选择等因素。此外,还应当考虑载体的拷贝数量、控制拷贝数量和载体编码的任何其他蛋白如抗生素标记的表达的能力。

[0113] 本发明的重组核酸可以通过将克隆的基因或其部分连接到适于在原核细胞或真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)中,或在两者中表达的载体而制备。制备重组ActRIIa多肽的表达载体包括质粒和其他载体。例如合适的载体包括下列类型的质粒:用于在大肠杆菌等原核细胞中表达的来源于pBR322的质粒、来源于pEMBL的质粒、来源于pEX的质粒、来源于pBTac的质粒以及来源于pUC的质粒。

[0114] 一些哺乳动物表达载体包含有助于载体在细菌中繁殖的原核序列,以及一个或多个在真核细胞中表达的真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg来源的载体是适合转染真核细胞的哺乳动物表达载体的例子。这些载体中的一部分被来自细菌质粒如pBR322的序列所修饰,以有助于原核细胞和真核细胞中的复制和药物抗性筛选。或者,病毒衍生物如牛乳

头瘤病毒 (BPV-1) 或 Epstein-Barr 病毒 (pHEBo、pREP 源的和 p205) 可用于在真核细胞中蛋白的瞬时表达。其他的病毒 (包括逆转录病毒的) 表达体系的例子可以在下面基因治疗传递系统 (gene therapy delivery system) 的描述中找到。质粒制备以及宿主生物体转化中采用的各种方法是本领域公知的。其它合适的原核和真核细胞的表达系统以及通用的重组过程参见 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在一些例子中, 使用杆状病毒表达系统表达重组多肽可能是合适的。这样的杆状病毒表达系统的例子包括 pVL 来源的载体 (如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941)、pAcUW 来源的载体 (例如 pAcUW1) 以及 pBlueBac 来源的载体 (如包含 pBlueBac III 的 β -gal)。

[0115] 在优选的实施方案中, 载体被设计用来在 CHO 细胞中生成目标 ActRIIa 多肽, 如 Pcmv-Script 载体 (Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4 载体 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 和 pCI-neo 载体 (Promega, Madison, Wisc.)。显然也, 目标基因构建物可用于引起目标 ActRIIa 多肽在培养基中繁殖的细胞中的表达, 例如产生蛋白包括融合蛋白或突变体蛋白, 用于纯化。

[0116] 本公开还涉及用包括一个或多个目标 ActRIIa 多肽的编码序列 (例如 SEQ ID NO:4 或 5) 的重组基因转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何的原核或真核细胞。例如本发明的 ActRIIa 多肽可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞 (例如采用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0117] 因此本发明进一步涉及制备目标 ActRIIa 多肽的方法。例如用编码 ActRIIa 多肽的表达载体转染的宿主细胞可在适宜条件下培养, 以使 ActRIIa 多肽得以表达。ActRIIa 多肽可分泌并从含有 ActRIIa 多肽的细胞和培养基的混合物中分离。或者, ActRIIa 多肽可留在细胞质中或作为膜组分保留, 收集、裂解细胞并分离蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。合适的细胞培养基是本领域公知的。目标 ActRIIa 多肽可从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离, 采用本领域已知的纯化蛋白的技术, 包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、使用 ActRIIa 多肽特定表位的特异性抗体的免疫亲和纯化, 以及使用能结合至融合到 ActRIIa 多肽的结构域的物质亲和纯化 (例如 A 蛋白柱可用于纯化 ActRIIa-Fc 融合蛋白)。在优选实施方案中, ActRIIa 多肽是包含有助于其纯化的结构域的融合蛋白。在优选实施方案中, 纯化通过一系列柱层析步骤实现, 包括例如以任何顺序的三个或更多的以下步骤: A 蛋白层析、Q 琼脂糖层析、苯基琼脂糖层析、尺寸排阻层析以及阳离子交换层析。纯化可以通过病毒过滤和缓冲液更换完成。如本文所证明的, ActRIIa-hFc 蛋白纯化至如尺寸排阻层析确定的纯度大于 98%, 如 SDS PAGE 确定的纯度大于 95%。此纯度水平足以在小鼠的骨骼上获得所需效果, 并在小鼠、大鼠和非人灵长类中得到可接受的安全性曲线。

[0118] 在另一实施方案中, 编码纯化前导序列的融合基因, 如重组 ActRIIa 多肽所需部分 N 末端的多聚 (His) / 肠激酶切割位点序列, 可供使用 Ni^{2+} 金属树脂通过亲和层析纯化所表达的融合蛋白之用。纯化前导序列随后可通过肠激酶处理去除, 从而提供纯化的 ActRIIa 多肽 (例如参见 Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; and Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972)。

[0119] 制备融合基因的技术是本领域公知的。本质上, 编码不同多肽序列的各种 DNA 片段的连接是依据常规技术, 采用平端或交错末端连接、限制性酶消化以提供合适的末端、适当

情况下填补粘性末端、碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接,以及酶连接进行的。在另一实施方案中,融合基因可以通过常规技术包括自动DNA合成仪来合成。或者,基因片段的PCR扩增可使用锚定引物进行,所述锚定引物导致两个连续的可随后退火产生嵌合基因序列的基因片段之间互补突出端(complementary overhang)(参见例如Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons; 1992)。

[0120] 4. 可选择的活化素和ActRIIa拮抗剂

[0121] 本文显示的数据证明了活化素-ActRIIa信号传导拮抗剂可用于降低FSH水平。尽管可溶性ActRIIa多肽,尤其ActRIIa-Fc是优选的拮抗剂,并且尽管这样的拮抗剂可通过除了活化素拮抗以外的机制影响FSH,预期其他类型的活化素-ActRIIa拮抗剂是有用的,包括抗活化素(例如A、B、C或E)抗体、抗ActRIIa抗体、反义物、抑制ActRIIa生成的RNAi或核酶核酸,以及其他的活化素或ActRIIa抑制剂,特别是那些扰乱活化素-ActRIIa结合的抑制剂。

[0122] 与ActRIIa多肽(例如可溶性ActRIIa多肽)特异性反应的抗体,以及与ActRIIa多肽竞争性结合至配体,或以其他方式抑制ActRIIa介导的信号传导的物质可用作ActRIIa多肽活性的拮抗剂。同样地,与活化素A多肽特异性反应的抗体以及干扰ActRIIa结合的物质可用作拮抗剂。

[0123] 使用来自ActRIIa多肽或活化素多肽的免疫原,可通过标准方法(参见例如Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press; 1988))制备抗蛋白/抗肽抗血清或单克隆抗体。哺乳动物,如小鼠、仓鼠或兔可用ActRIIa多肽的免疫原形式或融合蛋白免疫,ActRIIa多肽的免疫原形式是能够引发抗体反应的抗原片段。赋予蛋白或肽免疫原性的技术包括与载体的缀合或其他本领域公知的技术。ActRIIa或活化素多肽的免疫原部分可在有佐剂的情况下施用。免疫过程可通过检测抗体在血浆或血清中的滴度来监测。标准ELISA或其他免疫分析可与作为抗原的免疫原一起使用,以评估抗体水平。

[0124] 用ActRIIa多肽的抗原制剂免疫动物之后,得到抗血清,如果需要可以从血清中分离多克隆抗体。为产生单克隆抗体,可从免疫的动物收集产生抗体的细胞(淋巴细胞),并通过标准的体细胞融合步骤与骨髓瘤细胞等无限增殖的细胞融合,以产生杂交瘤细胞。这样的技术是本领域公知的,包括例如杂交瘤技术(最初由Kohler和Milstein开发,(1975) Nature, 256: 495-497)、人类B细胞杂交瘤技术(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72)以及生成人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)。杂交瘤细胞可以通过免疫化学筛选,以产生与ActRIIa多肽特异性反应的抗体,并且单克隆抗体从包含这样的杂交瘤细胞的培养基分离。

[0125] 本文所用的术语“抗体”意在包括也与目标多肽特异性反应的其片段。抗体可采用传统的技术片段化,并且如上所述以与全抗体相同方式的筛选片段用途。例如F(ab)₂片段可以通过用胃蛋白酶处理产生。可以处理所得的F(ab)₂片段,减少二硫桥来生成Fab片段。本发明的抗体进一步旨在包括由至少一个抗体CDR区赋予的对ActRIIa或活化素多肽有亲和性的双特异性的、单链的、嵌合的、人源化以及完全人源分子。抗体可进一步包括连接于其上的并能够被检测的标签(例如标签可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或辅酶因子)。

[0126] 在某些实施方案中,抗体是重组抗体,此术语包括了任意的部分通过分子生物学

技术产生的抗体,包括CDR移植的抗体或嵌合抗体,人的或组装自文库选择抗体结构域的抗体、单链抗体以及单结构域抗体(例如人V_H蛋白或驼类(camelid)V_H蛋白)。在某些实施方案中,本发明的抗体是单克隆抗体,并且在某些实施方案中,本发明提供产生新抗体的方法。例如生成能特异结合至ActRIIa多肽或活化素多肽的单克隆抗体的方法,可包括将一定量的包含有效刺激可检测免疫反应的抗原多肽的免疫原组合物给予小鼠,从小鼠获得抗体生成细胞(例如脾脏细胞)并将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合得到产生抗体的杂交瘤,并检测产生抗体的杂交瘤以鉴别产生特异性结合至抗原的单克隆抗体的杂交瘤。一旦获得,即在任意的杂交瘤源的细胞生成能特异性结合至抗原的单克隆抗体的培养条件下,在细胞培养基中繁殖杂交瘤。单克隆抗体可从细胞培养物纯化。

[0127] 使用于抗体的形容词“特异性地与之反应”意在指如本领域通常理解的,抗体在感兴趣的抗原(例如ActRIIa多肽)和其他不感兴趣的抗原之间有足够的选择性,这样抗体能用于最低程度地检测特定类型生物样品中感兴趣的抗原的存在。在某些使用抗体的方法中,如治疗应用中,更高层次的结合特异性可能是所需的。单克隆抗体通常更趋向(与多克隆抗体相比)于有效地区分所需抗原以及交叉反应多肽。影响抗体:抗原相互作用特异性的一个特征是抗体对抗原的亲合力。尽管所需特异性可达到不同亲和力的范围,但通常优选的抗体的亲合力(解离常数)为约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更少。假如活化素和ActRIIa间异常紧密结合,则预期中和抗活化素或抗ActRIIa抗体通常有 10^{-10} 或更少的解离常数。

[0128] 另外,用于筛选抗体以鉴定所需抗体的技术可影响获得的抗体的特性。例如如果抗体要用于在溶液中结合抗原,则理想的可能是测试溶液结合。有各种测试抗体与抗原间相互作用,以鉴别尤其可取的抗体的不同技术。这样的技术包括ELISA、表面等离子共振结合分析(例如Biacore™结合分析,Biacore AB,Uppsala,Sweden)、夹心法(例如IGEN International,Inc.的顺磁性磁珠体系,Gaithersburg,Maryland)、蛋白质印迹、免疫沉淀分析以及免疫组织化学。

[0129] 作为活化素或ActRIIa拮抗剂的核酸化合物的种类的例子包括反义核酸、RNAi构建物以及催化核酸构建物。核酸化合物可以是单链的或双链的。双链化合物还可以包括突出端或非互补区,这里一个或另外的链是单链。单链化合物可包括自身互补区,意味着该化合物可形成具有双螺旋结构的所谓“发夹”或“茎环”结构。核酸化合物可包括与由全长ActRIIa核酸序列或活化素BA或活化素BB核酸序列的不超过1000,不超过500,不超过250,不超过100或不超过50、35、30、25、22、20或18个核苷酸组成的区互补的核苷酸序列。互补区优选是至少8个核苷酸,任选是至少10个或至少15个核苷酸,任选地在15和25个核苷酸之间。互补区可落在内含子、靶转录物编码序列或非编码序列,如编码序列部分的范围内。通常核酸化合物会有约8至约500个核苷酸或碱基对的长度,任选地长度可以是约14到约50个核苷酸。核酸可以是DNA(尤其作为反义核酸使用)、RNA或RNA:DNA杂合体。任何一条链可包括DNA和RNA的混合物,以及不能容易地归类为或DNA或RNA的修饰的形式。同样地,双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA,并且任何一条链还可以包括DNA和RNA的混合物,以及不能容易地归类为或DNA或RNA的修饰的形式。核酸化合物可以包括任意的各种修饰,包括骨架(天然核酸的糖磷酸酯部分,包括核苷间连接键)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一个或多个修饰。反义核酸化合物优选具有约15至约30个核苷酸长度,并通常包含一个或多个修饰以改善稳定性等特性,所述稳定性如血清中,细胞中或化合物可能的给

药位置,如胃(就口服给药化合物而言)以及肺(对于吸入的化合物)中的稳定性。就RNAi构建物而言,互补于靶转录物的链通常是RNA或其修饰形式。其他链可以是RNA、DNA或任何其他变异。双链或单链“发夹”RNAi构建物的双螺旋部分优选地有18到40个核苷酸长度,任选地约21到23个核苷酸长度,只要其作为Dicer底物起作用。催化的或酶促核酸可以是核酶或DNA酶,还可含有修饰的形式。当在生理条件下以及无义或有义调控几乎没有或没有作用的浓度下与细胞接触时,核酸化合物可能抑制约50%、75%、90%或更多的靶表达。优选的检测核酸化合物作用的浓度为1、5和10 μ M。也可测试核酸化合物对体内FSH水平、体外细胞系的FSH产生或FSH相关紊乱的作用。

[0130] 5. 筛选方法

[0131] 在某些方面,本发明涉及使用ActRIIa多肽(例如可溶性ActRIIa多肽)和活化素多肽,来鉴定是活化素-ActRIIa信号传导通路的激动剂或拮抗剂的化合物(药物)。可检测通过这种筛选鉴定的化合物,以评估它们在体内或体外调节癌细胞尤其是前列腺癌细胞生长或存活的能力。这些化合物可以例如在动物模型诸如小鼠异种移植模型中检测。一种有用的动物模型是啮齿类LAPC-4前列腺癌模型(描述于U.S. Pat No. 7,122,714)。可例如通过植入LNCaP细胞来产生前列腺癌的其他动物模型。LNCaP细胞系是已建立的雄激素响应性前列腺癌细胞系,获得自前列腺癌患者的淋巴结转移物。

[0132] 有很多通过靶向活化素和ActRIIa信号转导来筛选减少或抑制FSH分泌的治疗药物的方法。在某些实施方案中,可进行化合物的高通量筛选,鉴别干扰活化素或ActRIIa介导的对所选细胞系的作用的物质。在某些实施方案中,进行该分析,筛选和鉴定特异性抑制或减少ActRIIa多肽结合至活化素的化合物。或者,所述分析可用于鉴定增强ActRIIa多肽结合至活化素的化合物。在另一实施方案中,化合物可通过其与活化素或ActRIIa多肽相互作用的能力来鉴定。

[0133] 各种分析形式是足够的,并且根据本公开,那些本文没有明确描述的仍然可被本领域普通技术人员领会。如本文所描述的,可通过任何组合化学方法创造待测化合物(药物)。或者,目标化合物可以是天然存在的体内或体外合成的生物分子。其作为组织生长调节剂起作用的能力待测的化合物(药物)可例如通过细菌、酵母、植物或其他生物体生成(例如天然产物),化学制备(例如小分子,包括拟肽类),或重组制备。本文考虑的待测化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、拟肽类、糖、激素和核酸分子。在具体实施方案中,待测药物是分子量小于约2,000道尔顿的小的有机分子。

[0134] 待测化合物可以单个的、离散的实体形式提供,或是在更大复杂度的文库中,如组合化学制备的库中提供。这些库可以包括例如乙醇、卤代烷、胺、酰胺、酯、醛、醚以及其他类的有机化合物。出现在检测系统的待测化合物可以是分离形式或化合物的混合物形式,特别是在起始筛选步骤中。任选地,化合物可以任选用其他化合物衍生化,并具有有助于化合物分离的衍生化基团。衍生化基团的非限制性例子包括生物素、荧光素、地高辛、绿色荧光蛋白、同位素、多组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S转移酶(GST)、光学可激活交联剂或其任意组合。

[0135] 在许多检测化合物库和天然提取物的药物筛选程序中,为了使给定时期内测量的化合物数量最大化,高通量分析是可取的。在例如可用纯化的或半纯化的蛋白衍生化的无细胞系统中进行的分析通常优选作为“初步”筛选,因为它们可被构建成能允许快速开发,并相对容易地检测待测化合物介导的靶分子中的改变。此外,待测化合物的细胞毒性或生物

利用度的影响在体外系统中通常可以忽视,由于对ActRIIa多肽和活化素间结合亲和力的改变可能是明显的,所述分析相反主要着重于药物对分子靶标的作用上。

[0136] 仅仅是举例说明,在示例性筛选分析中,感兴趣的化合物与分离并纯化的通常能结合至活化素的ActRIIa多肽相接触。然后往化合物与ActRIIa多肽的混合物中加入含有ActRIIa配体的组合物。ActRIIa/活化素复合物的检测和定量提供了确定化合物抑制(或增强)ActRIIa多肽与活化素之间形成复合物的效力的方法。化合物的效力可通过从使用各种浓度的待测化合物获得的数据作剂量反应曲线进行评估。此外,也可进行对照分析,提供比较用的基准。例如在对照分析中,分离和纯化的活化素加到含有ActRIIa多肽的组合物中,在没有待测化合物的情况下定量ActRIIa/活化素复合物的形成。应当了解,通常其中反应物的混合顺序可变化,并且可以同时混合。此外,可使用细胞提取物和溶胞产物代替纯化的蛋白,以提供合适的无细胞分析系统。

[0137] ActRIIa多肽与活化素间复合物的形成可以由各种技术检测。例如,复合物形成的调节可使用例如可检测标记的蛋白例如放射性标记的(如³²P、³⁵S、¹⁴C或³H)、荧光标记的(如FITC),或酶标记的ActRIIa多肽或活化素,通过免疫分析或通过层析法检测来定量。

[0138] 在某些实施方案中,可使用荧光偏振分析和荧光共振能量转移(FRET)分析直接或间接测量ActRIIa多肽及其结合蛋白间相互作用的程度。其他的检测模式,包括例如基于光波导(PCT公开W0 96/26432和美国专利No. 5,677,196)、表面等离子共振(SPR)、表面电荷传感器以及表面力传感器的那些。

[0139] 也可使用相互作用陷阱分析,也称为“双杂交分析”,以鉴定干扰或加强ActRIIa多肽与其结合蛋白间相互作用的物质。参见例如美国专利No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; and Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696)。在特定实施方案中,可使用反向双杂交系统,鉴定使ActRIIa多肽与其结合蛋白间相互作用解除的化合物(例如小分子或肽)。参见例如Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; 以及美国专利Nos. 5,525,490; 5,955,280; 和5,965,368。

[0140] 在某些实施方案中,化合物通过其与本文描述的ActRIIa或活化素多肽相互作用的能力来鉴定。化合物与ActRIIa或活化素多肽之间的相互作用可以是共价的或非共价的。例如这种相互作用可以使用体外生物化学方法,包括光交联、放标记配体结合,以及亲和层析,在蛋白水平上鉴定(Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46:1)。在某些例子中,化合物可在基于机制的分析,例如检测能结合至活化素活化素或ActRIIa多肽的化合物的分析中筛选。这可包括固相或液相结合事件。或者,编码活化素或ActRIIa多肽的基因可与报道基因系统(例如β-半乳糖苷酶、荧光素酶或绿色荧光蛋白)转染到细胞中,并任选通过高通量筛选来筛选文库,或与文库中的各成员一同转染。可使用其他基于机制的结合分析,例如检测自由能变化的结合分析。结合分析可用固定至孔、珠或芯片或被固定化抗体捕获或被毛细管电泳解离的靶标进行。被结合的化合物通常可采用比色法或荧光或表面等离子共振检测。

[0141] 6. 示范性治疗应用

[0142] 在某些实施方案中,本发明提供通过给予个体治疗有效量的活化素-ActRIIa拮抗

剂诸如例如ActRIIa多肽而在有此需要的个体中减少或抑制FSH分泌的方法。减少或抑制FSH分泌的方法包括产生所述作用的所有方法,所述作用包括例如减少FSH转录、翻译、翻译后处理和分泌。有多种试剂盒可用于检测血浆FSH水平,包括MENOCHECK™。男性中FSH的正常值在2-18mIU/ml血液范围内。女性中FSH的正常值在5-25mIU/mL范围内。健康女性中高于50mIU/mL的水平与绝经相关。可通过检测唾液(eMHP™)确定FSH的组织浓度。

[0143] 在某些实施方案中,本发明提供通过给予个体治疗有效量的活化素-ActRIIa拮抗剂(例如ActRIIa多肽)以减少或抑制FSH分泌从而在有此需要的个体中治疗或预防前列腺癌的方法。这些方法可用于对具有发展前列腺癌的高风险的人(尤其是男性)的治疗性和预防性治疗。由于每一位男性都处于发展前列腺癌的风险中,具有发展前列腺癌的高风险的男性是与普通人群或处于某年龄段的男性人群相比,其风险因素赋予更大发展该病可能性的男性。示例性的风险因素包括年龄、家族史或遗传特性(genetic makeup)、生活方式习惯(例如锻炼和饮食)、以及暴露于辐射或其它致癌剂。

[0144] 本文所用的“预防”疾病或病症的治疗指在统计样本中,相对于未治疗对照样本,化合物在治疗样本中可减少该疾病或病症的发生,或者相对于未治疗样本,可延迟该疾病或病症的一种或多种症状或特征的发生。例如,预防前列腺癌可指治疗后没有新的病变,或者没有或延迟转移性疾病。

[0145] 术语“治疗前列腺癌”系指相对于未治疗对照或相对于治疗前疾病的严重性,对该疾病一种或多种症状或特征的改善。该术语并不必然地要求接受治疗的患者痊愈或者该疾病从患者完全根除。治疗前列腺癌的药剂可以是减轻该疾病一种或多种症状或特征严重性的药剂。请注意肿瘤生长与进展受多种因素影响,包括细胞周期进展与细胞分裂的媒介因子、以及细胞死亡或凋亡的调节因子。因此,治疗前列腺癌可涉及癌细胞增殖减少或细胞分裂速率减少。替代性地或另外,治疗前列腺癌可涉及癌细胞存活减少或凋亡增加。因此,在某些实施方案中,治疗前列腺癌可涉及细胞分裂减少和细胞死亡增多。不考虑机制,治疗前列腺癌的药剂的有效性可通过可观察的标准确定,例如比对照更少数量的癌细胞(由于增殖减少、凋亡增加、或两者)、或比对照减小的肿瘤尺寸。所以治疗前列腺癌或者抑制肿瘤或癌细胞生长预期与导致如此变化发生的机制无确定关联。预防和治疗都可在医生或其他卫生保健提供者所提供的诊断和给予治疗药剂预期效果的分析中得到阐明。

[0146] 当观察测试拮抗剂对人类前列腺癌进展的效果时,可通过可测量疾病的减少或消失、和/或没有新病变、或防止转移来评估效果。例如,活化素-ActRIIa拮抗剂可显著地减少或延迟患有非扩散性和扩散性前列腺癌的患者的前列腺癌进展。此外,该拮抗剂可在具有该疾病风险因素的健康男性中预防或降低罹患前列腺癌的风险。该拮抗剂还可在具有该病史的患者中降低前列腺癌复发的风险。

[0147] 因此,活化素-ActRIIa拮抗剂可用于在被认为有风险罹患该疾病的个体中预防或延迟前列腺癌的发生,并且该拮抗剂可用于选定的患者人群。合适的患者人群的实例包括具有前列腺癌家族史的患者,例如父亲或兄弟已被诊断患有该疾病的男性患者。在一种实施方案中,用活化素-ActRIIa拮抗剂治疗被认为具有高度风险罹患前列腺癌但尚未诊断患有该疾病的患者。该治疗可在该患者年龄到达30、40、50、60、或者70岁。

[0148] 本文公开的活化素-ActRIIa拮抗剂,尤其是ActRIIa-Fc蛋白,可用于治疗或预防患者的前列腺癌,包括患实体瘤的患者以及患转移性癌症的患者。活化素-ActRIIa拮抗剂

也可给予具有下列症状的人类对象：前列腺癌前病变或良性病变，或者任何异常增殖性病变，包括典型增生、非典型增生，以及非扩散性或原位癌。本发明所述的拮抗剂还可用于治疗或预防激素依赖性或非激素依赖性癌症和非激素依赖性癌症（例如激素不应性前列腺癌）。活化素-ActRIIa拮抗剂可证实在表达水平升高（相对于来源于正常前列腺组织的细胞）的活化素（例如A、AB或B）或者水平升高的ActRIIa或ActRIIb的肿瘤中尤其有用。

[0149] 某些实施方案中，本发明提供通过给予个体治疗有效量的活化素-ActRIIa拮抗剂诸如例如ActRIIa多肽而在患有FSH分泌型垂体瘤的个体中减少或抑制FSH分泌的方法。抑制这些垂体瘤中FSH的过多分泌对于减少肿瘤症状诸如雌激素水平增加和发展卵巢囊肿是有用的治疗。本发明方法优选与常规癌症疗法诸如手术联合使用，然而，单独地抑制FSH分泌可能是有效的治疗，尤其是在禁忌用手术或放射治疗的情况中。

[0150] 本发明意识到通过使用对象拮抗剂可增强传统癌症疗法（化疗、放射疗法、光线疗法、免疫疗法、和手术，尤其是前列腺切除术）的有效性。因此，活化素-ActRIIa拮抗剂可用于治疗、预防、或控制前列腺癌的联合疗法。该拮抗剂可结合放射和/或手术治疗，以及细胞毒化疗和/或内分泌疗法给予患者。这样的联合疗法可协同作用并允许减少每个单独疗法的剂量，由此减少每个疗法高剂量时出现的有害副作用。在其它情况下，某一疗法难以治疗的恶性肿瘤可对两个或多个不同疗法组成的联合疗法有应答。因此，本发明涉及活化素-ActRIIa拮抗剂与另一种传统抗肿瘤药剂同时或先后联合给予，其目的为增强该抗肿瘤药剂的疗效或克服对该抗肿瘤药剂的细胞抗性。本公开还涉及与激素疗法联合给予活化素-ActRIIa拮抗剂。活化素-ActRIIa拮抗剂还可用于联合治疗中以减少由FSH分泌型垂体瘤引起的症状。仅为阐述目的，可用于联合抗肿瘤疗法的药物化合物包括：氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、天门冬酰胺酶、卡介苗、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林 (buserelin)、白消安、喜树碱 (camptothecin)、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、秋水仙素、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔红霉素、双烯雌酚、己烯雌酚、多西紫杉醇 (docetaxel)、阿霉素、表阿霉素、雌二醇、雌氮芥、鬼臼乙叉苷、依西美坦、非格司汀 (filgrastim)、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺 (flutamide)、吉西他滨、染料木黄酮、戈舍瑞林 (goserelin)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、依立替康、依罗替康、来曲唑、甲酰四氢叶酸、亮丙瑞林 (leuprolide)、左旋咪唑、洛莫司汀 (lomustine)、氮芥、甲孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、2-巯乙基磺酸盐、氨甲喋呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、巴鲁米特 (nilutamide)、诺可唑、抑生长肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米磷酸盐、戊制菌素、光辉霉素、卟吩姆钠 (porfimer)、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲菌素、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫代鸟嘌呤、塞替派、二氯化二茂钛、抑拓扑酶素、曲妥珠单抗、维A酸 (tretinoin)、长春花碱、长春新碱、脱乙酰长春花碱和脱水长春花碱。

[0151] 这些化疗抗肿瘤化合物可基于其作用机制分为例如如下各组：抗代谢物/抗癌剂，例如嘧啶类似物（5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷）和嘌呤类似物、叶酸盐 (folate) 拮抗剂和相关抑制剂（巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷（克拉屈滨））；抗增殖/抗有丝分裂药剂，包括天然产物，例如长春花生物碱（长春碱、长春新碱和长春瑞滨），微管破坏剂例如紫杉烷（紫杉醇、多西他赛）、长春新碱 (vincristin)、长春碱 (vinblastin)、诺考达唑、埃坡霉素和诺维本、表二鬼臼毒素 (epidipodophyllotoxins)（鬼

依托泊苷、替尼泊苷)、DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶、葱环类、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺(cytosan)、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲三聚氰胺奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、美录瑞塔明(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素,例如放线菌素D(actinomycin D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、葱环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶类(L-天冬酰胺酶,其全身性代谢L-天冬酰胺,抑制不能自己合成天冬酰胺的细胞);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,例如氮芥类(氮芥、环磷酰胺及其类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、氮丙啶和甲基三聚氰胺类(六甲三聚氰胺和塞替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲类(卡莫司汀(BCNU)及其类似物、链脲菌素)、曲嗪类(trazenes)-达卡巴嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物,例如叶酸类似物(氨甲喋呤);铂络合复合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素类、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和其它凝血酶抑制剂);纤维蛋白溶解剂(例如组织纤溶酶原激活物、链球菌激酶和尿激酶)、阿司匹林、潘生丁、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗转移剂;抗分泌剂(布雷韦林)(breveldin);免疫抑制剂(环孢霉素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、麦考酚酸酯);抗血管形成化合物(TNP-470、染料木黄酮)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻断剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗);细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维A酸);mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、放线菌素D、恩尼泊苷(eniposide)、表柔比星、依托泊苷、伊达比星和米托蒽醌、抑拓扑酶素、依立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松和泼尼松龙);生长因子信号转导激酶抑制剂;线粒体机能障碍诱导剂和半胱氨酸蛋白水解酶激活剂;以及染色质破坏剂。

[0152] 在某些实施方案中,可用于联合疗法的药物化合物包括抗血管生成剂,例如(1)“血管生成分子”的释放抑制剂,例如bFGF(碱性成纤维细胞生长因子);(2)血管生成分子的中和剂,例如抗 β bFGF抗体;以及(3)内皮细胞对血管生成刺激应答的抑制剂,包括胶原酶抑制剂、基膜更新抑制剂、血管生成抑制类固醇(angiostatic steroids)、源于真菌的血管生成抑制剂、血小板因子4、血小板反应蛋白、关节炎药物(例如D-青霉胺和硫代苹果酸金)、维生素D3类似物、 α 干扰素等等。另外提议的血管生成抑制剂参见Blood等人, Bioch. Biophys. Acta., 1032:89-118 (1990), Moses等人, Science, 248:1408-1410 (1990), Ingber等人, Lab. Invest., 59:44-51 (1988), 以及美国专利5,092,885、5,112,946、5,192,744、5,202,352和6573256。此外,有多种化合物可用于抑制血管生成,例如,阻断VEGF介导的血管生成途径的肽或试剂、内皮抑素蛋白或其衍生物、血管新生抑制素的赖氨酸结合片段、黑色素或促黑色素化合物、纤维蛋白溶酶原片段(例如纤维蛋白溶酶原的Kringles 1-3)、肌钙蛋白(tropoin)亚基、玻连蛋白 $\alpha v \beta 3$ 的拮抗剂、源自Sapoin B的肽、抗生素或其类似物(例如四环素或新霉素)、包含地诺孕素的组合物、包含偶联至肽的MetAP-2抑制核心的化合物、化合物EM-138、查耳酮及其类似物、N-乙酰 α 连接的酸性二肽酶(naaladase)抑制剂。参见,例如,美国专利6,395,718、6,462,075、6,465,431、6,475,784、6,482,802、6,482,810、6,500,431、6,500,924、6,518,298、6,521,439、6,525,019、6,538,103、6,544,758、6,

544,947,6,548,477,6,559,126和6,569,845。

[0153] 取决于联合疗法的性质,可在其它疗法正在施用时和/或之后继续给予本发明的治疗性拮抗剂。本文所述的拮抗剂可以单剂量或多剂量给予。在一些情况下,在传统疗法之前至少数天开始给予拮抗剂,而在另外的情况下,紧邻施用传统疗法之前或施用传统疗法时开始给予。

[0154] 本申请的一个方面提供对生育力有用的方法和组合物。通过给予活化素-ActRIIa拮抗剂减少或抑制FSH分泌是抑制精子成熟的有用方法。在女性中,FSH的减少能够限制卵巢中卵泡粒膜细胞的增殖。通过给予活化素-ActRIIa拮抗剂减少或抑制FSH分泌是避孕的有用方法。FSH减少还可以延迟卵巢内卵泡的成熟,从而推迟女性中有限数目的卵泡的成熟。这种治疗具有增加自然受精可能性和在生命中较晚怀孕可能性的潜力。通过减少FSH分泌而延迟卵巢内卵泡的成熟还可用于防止卵母细胞耗竭(化疗或设计用于快速治疗分裂中的细胞的类似治疗的常见副作用)。

[0155] 本发明还提供新组合物,其包含一种或多种活化素-ActRIIa拮抗剂并联合一种或多种避孕剂。示例性避孕剂包括雌激素、孕激素、黄体激素(例如异炔诺酮、炔诺酮、诺孕酯、炔诺孕酮、左炔诺孕酮、甲羟孕酮和去氧孕烯)、奥美昔芬(Ormeloxifene)(Centchroman)。

[0156] 某些实施方案中,本发明提供通过给予个体治疗有效量的活化素-ActRIIa拮抗剂诸如例如ActRIIa多肽以减少或抑制FSH分泌从而在有此需要的个体中治疗或预防雌激素相关紊乱的方法。由于FSH对雌激素合成的控制功能,FSH分泌的减少还可能有效治疗雌激素相关紊乱,诸如子宫肌瘤、子宫内膜异位、多囊卵巢病、功能失调性子宫出血和卵巢癌。

[0157] 7. 药物组合物

[0158] 在某些实施方案中,本发明的活化素-ActRIIa拮抗剂(例如ActRIIa多肽)与药学上可接受的载体一起配制。例如,ActRIIa多肽可单独或作为药物制剂(治疗组合物)的成分给药。目标化合物可以配制成以任何便利的方式用于人或兽药的给药形式。

[0159] 在某些实施方案中,本发明的治疗方法包括全身性施用组合物或以植入体或装置局部给药。给药时,用于本发明的治疗组合物是无热原的、生理上可接受的形式。在本发明的方法中,除了如上所述也可以任选地包括在上述组合物中的ActRIIa拮抗剂外,治疗有效的药物可与目标化合物(例如ActRIIa多肽)同时或相继给药。

[0160] 通常ActRIIa拮抗剂会在胃肠外给药,尤其是静脉注射或皮下给药。适合胃肠外给药的药物组合物可包括一种或多种ActRIIa多肽以及与之组合的一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散剂、混悬剂或乳剂,或临用前可复溶成无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉末,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与目标受者的血液等渗的溶质或助悬剂或增稠剂。可被本发明的药物组合物采用的合适的水和非水载体的例子包括水、乙醇、多羟基化合物(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)及其合适的混合物,植物油如橄榄油,以及可注射有机酯如油酸乙酯。例如可通过使用包衣材料如卵磷脂,通过保持分散剂的所需颗粒大小,并通过使用表面活性剂,可保持适当的流动性。

[0161] 在某些实施方案中,本发明的方法可以口服给药,例如以胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(采用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯树胶或西黄蓍胶)、粉末剂、颗粒剂,或在含水或非水液体中的溶液剂或混悬剂,或水包油或油包水的液体乳剂,或酞剂或糖浆剂,或软锭剂(采用惰性基质,如凝胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)和/或漱口剂等的形式,每种都

包含预定量的作为活性成分的药物。药物也可以以大丸剂、干药糖剂或糊剂给药。

[0162] 在口服给药的固态剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末剂、颗粒剂等等)中,本发明的一种或多种治疗化合物可与一种或多种药学上可接受的载体,如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或任何下面的物质混合:(1)填充剂或膨胀剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,如羧甲基纤维素、藻酸盐、凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3)湿润剂如甘油;(4)崩解剂,如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠;(5)溶液缓释剂,如石蜡;(6)吸收促进剂,如季铵化合物;(7)润湿剂,如十六醇和甘油单硬脂酸酯;(8)吸收剂,如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁和固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;以及(10)着色剂。在胶囊剂、片剂以及丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。使用如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等等这样的辅料,相似类型的固态组合物也可用作软的或硬的填充明胶胶囊的填充剂。

[0163] 口服给药的液态剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酞剂。除活性成分外,液态剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂,如水或其他溶剂,增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(尤其是棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻以及芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇以及山梨聚糖的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括如润湿剂、乳化和混悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、香味剂以及防腐剂的辅料。

[0164] 除了活性化合物外,混悬剂可含有如乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏铝酸(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂-琼脂和西黄蓍胶及其混合物的助悬剂。

[0165] 本发明的组合物还可含有辅料,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗菌和抗真菌药,如尼泊金类、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保防止微生物的活动。组合物中包括等渗剂,如糖、氯化钠等,这可能也是可取的。此外,注射药物形式的延长吸收可通过包含延迟吸收的物质,如单硬脂酸铝和凝胶产生。

[0166] 可以理解,给药方案会由主治医师考虑各种改变本发明的目标化合物(例如ActRIIa多肽)作用的因素后确定。所述各种因素包括但不限于需要的FSH水平降低程度、疾病严重性、患者年龄、性别和饮食、可能促进骨丢失的任何疾病的严重程度、给药时间以及其他临床因素。加到最终组合物中的其他已知生长因子也可影响剂量。进程可通过定期评估FSH水平或与待治疗的FSH相关紊乱有关的其他症状来监测。

[0167] 灵长类动物和人类实验已经表明,当化合物的给药间隔和量足以达到约1000ng/ml的血清浓度时,ActRIIa-Fc对FSH的作用是可检测的,在剂量为0.3mg/kg或相当的曲线下面积时出现对FSH的显著效应。在人类中,1000ng/ml的血清水平可通过0.3mg/kg或更高的单剂量达到,1000ng/ml的血清药物水平可通过0.3mg/kg或更高的单剂量达到。观察到的分子的血清半衰期在约25天到35天之间,显著长于大多数Fc融合蛋白,因此持久有效的血清水平可例如通过根据每周或双周给药约0.05-0.5mg/kg,或采用更高的剂量和给药之间更长的时间间隔实现。例如,每月或双月可使用例如0.1、0.3、0.5、0.7、1、2或3mg/kg的剂量或之间的值,对骨骼的效果足够持久,这样每3、4、5、6、9、12或更多个月仅需给药一次。给药之间更长的时间间隔进一步由药效持续时间支持,该药效持续时间比血清中药物持续时间

长。观察人患者至少120天的PD作用。

[0168] 在某些实施方案中,本发明还提供了体内产生ActRIIa多肽的基因治疗。这样的治疗会通过将ActRIIa多核苷酸序列引入患有如上所列疾病的细胞或组织中,实现其治疗效果。ActRIIa多核苷酸序列的递送可使用重组表达载体如嵌合病毒或胶体分散体系实现。ActRIIa多核苷酸序列的治疗递送优选使用靶向脂质体。

[0169] 本文所教导的各种可用于基因治疗的病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘,或优选RNA病毒如逆转录病毒。优选地,逆转录病毒载体是鼠类或鸟类逆转录病毒的衍生物。可插入单个外源基因的逆转录病毒的例子包括但不限于:莫洛尼鼠类白血病病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠类乳腺肿瘤病毒(MuMTV)以及劳氏肉瘤病毒(RSV)。大量其他的逆转录病毒载体可包含多个基因。所有这些载体可转移或包含选择性标记的基因,从而可鉴别并生成转导细胞。逆转录病毒载体可通过连接例如糖、糖脂或蛋白质而制成靶特异性的。使用抗体实现优选的靶向。本领域技术人员会意识到特异性多核苷酸序列可插入到逆转录病毒基因组中或连接到病毒包膜,以使含有ActRIIa多核苷酸的逆转录病毒载体得以靶特异性递送。在优选实施方案中,载体靶向作用于骨骼或软骨。

[0170] 或者,组织培养细胞可通过常规磷酸钙转染,用编码逆转录病毒结构基因gag、pol和env的质粒直接转染。然后这些细胞用含有感兴趣的基因的载体质粒转染。得到的细胞将逆转录病毒载体释放到培养基中。

[0171] 另一ActRIIa多核苷酸的靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠子以及基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束以及脂质体。本发明优选的胶体系统是脂质体。脂质体是用作体外和体内递送载体的人工膜囊。RNA、DNA以及完整的病毒粒子可包封在含水的内部中,并以生物活性形式递送到细胞(见例如Fraleley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。采用脂质体载体高效转运基因的方法是本领域已知的,参见例如Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988。脂质体组合物通常是磷脂的组合,通常与甾族化合物特别是胆固醇组合。也可使用其他的磷脂或其他的脂质。脂质体的物理特性依赖于pH、离子强度以及二价阳离子的存在。

[0172] 用于生产脂质体的脂质的例子包括磷脂酰化合物,如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、脑苷脂和神经节苷脂。示例性的磷脂包括蛋黄磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向也可能基于例如器官特异性、细胞特异性以及细胞器特异性,并且为本领域所知。

[0173] 实施例

[0174] 本发明现在是一般性描述,通过参照下述实施例会更容易理解,包括的实施例仅为解释某些实施方案以及本发明实施方案的目的,并不打算用于限制本发明。

[0175] 实施例1:ActRIIa-Fc融合蛋白

[0176] 申请人构建了具有融合至人或小鼠Fc结构域的人ActRIIa胞外结构域的可溶性ActRIIa融合蛋白,两结构域之间用最小的接头连接。构建物分别称为ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc。

[0177] 从CHO细胞系纯化的ActRIIa-hFc如下显示(SEQ ID NO:7):

[0178] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD

TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0179] ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc蛋白在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列：

[0180] (i) 蜜蜂蜂毒溶血肽 (mellitin) (HBML) :MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO:8)

[0181] (ii) 组织型纤溶酶原激活剂 (TPA) :MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO:9)

[0182] (iii) 天然的:MGAAAKLAFVFLISSSGA (SEQ ID NO:10) .

[0183] 选择的形式采用TPA前导序列并具有以下未加工的氨基酸序列：

[0184]

MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

[0185] 该多肽由下面的核苷酸序列编码：

[0186]

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGTTTCGTTTCGCCCGCGCCGCTAT ACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGT TGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAT AGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG AAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGTCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

[0187] ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc都格外易于重组表达。如图1所示,蛋白纯化为边界清晰的单峰蛋白。N末端测序显示了-ILGRSETQE (SEQ ID NO:11) 的单个序列。纯化可通过一系列的柱层析步骤完成,包括例如任何顺序的三个或多个以下步骤:A蛋白层析、Q琼脂糖层析、苯基琼脂糖层析、尺寸排阻层析以及阳离子交换层析。纯化可通过病毒过滤以及缓冲液更换完成。ActRIIa-hFc蛋白纯化至如尺寸排阻层析确定的纯度大于98%,如SDS PAGE确定的纯度大于95%。

[0188] ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc显示了对配体,尤其是对活化素A的高亲和性。GDF-11

或活化素A (“ActA”)用标准胺偶联步骤固定在Biacore CM5芯片上。ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc蛋白加样至系统,并测量结合。ActRIIa-hFc结合至活化素的解离常数(K_D)为 5×10^{-12} ,蛋白结合至GDF11的 K_D 为 9.96×10^{-9} 。见图2。ActRIIa-mFc表现类似。

[0189] A-204报告基因分析用于评价ActRIIa-hFc蛋白对GDF-11和活化素A介导的信号传导的影响。细胞系:人横纹肌肉瘤(来自肌肉)。报告载体:pGL3 (CAGA) 12(在Dennler et al, 1998,EMBO 17:3091-3100中描述)。参见图3。CAGA12基序存在于TGF- β 应答基因(PAI-1基因)中,因此这个载体可通用于通过Smad2和3的因子信号传导。

[0190] 第一天:把A-204细胞分到48孔板中。

[0191] 第二天:A-204细胞用 $10 \mu\text{g}$ pGL3 (CAGA) 12或pGL3 (CAGA) 12 ($10 \mu\text{g}$) +pRLCMV ($1 \mu\text{g}$) 和Fugene转染。

[0192] 第三天:加入因子(用培养基+0.1%BSA稀释)。加入到细胞之前,需要将抑制剂与因子预孵育1小时。6小时后,细胞用PBS洗涤,裂解细胞。

[0193] 此后是荧光素酶分析。通常在该分析中,在没有任何抑制剂存在下,活化素A对报告基因表达显示约10倍的刺激作用,ED50 $\sim 2 \text{ng}/\text{m}$ 。GDF-11:16倍刺激,ED50: $\sim 1.5 \text{ng}/\text{ml}$ 。GDF-8显示类似于GDF-11的效果。

[0194] 如图4中所示,皮摩尔浓度的ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc抑制GDF-8介导的信号传导。如图5所示,三种不同的ActRIIa-hFc制剂抑制GDF-11信号传导,IC50大约200pM。

[0195] 在药代动力学研究中ActRIIa-hFc非常稳定。大鼠给予 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 或 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 剂量的ActRIIa-hFc蛋白,在24、48、72、144和168小时测量该蛋白的血浆水平。在单独的研究中,大鼠给予 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 或 $30 \text{mg}/\text{kg}$ 的剂量。大鼠中,ActRIIa-hFc的血清半衰期为11-14天,两周后药物的循环水平相当高(起始剂量 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 或 $30 \text{mg}/\text{kg}$ 分别对应 $11 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $110 \mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $304 \mu\text{g}/\text{ml}$)。食蟹猴中,血浆半衰期显著大于14天,药物的循环水平为 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $304 \mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $1440 \mu\text{g}/\text{ml}$,分别对应起始浓度 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 或 $30 \text{mg}/\text{kg}$ 。人类中的初步结果显示,血清半衰期在约20至30天之间。

[0196] 实施例2:ActRIIa-mFc在体内促进骨骼生长

[0197] 正常雌性小鼠(BALB/c)给予 $1 \text{mg}/\text{kg}/\text{次}$ 、 $3 \text{mg}/\text{kg}/\text{次}$ 或 $10 \text{mg}/\text{kg}/\text{次}$ 水平的ActRIIa-mFc,每周给药2次。骨矿密度和骨矿含量通过DEXA确定,见图6。

[0198] 在BALB/c雌性小鼠中,DEXA扫描显示ActRIIa-mFc治疗使骨矿密度和含量显著增加($>20\%$)。见图7和8。

[0199] 因此,ActRIIa的拮抗引起正常雌性小鼠骨密度和含量增加。下一步检测了ActRIIa-mFc对骨质疏松症小鼠模型中骨骼的作用。

[0200] Andersson et al. (2001)证实,切除卵巢的小鼠遭受重大的骨丢失(术后6周大概丢失了50%的小梁骨),并且这些小鼠中的骨丢失可用候选治疗药物如甲状旁腺激素纠正。

[0201] 申请人采用4-5周龄时切除卵巢(OVX)或假手术的C57BL6雌性小鼠。术后8周,开始用ActRIIa-mFc ($10 \text{mg}/\text{kg}$,每周两次)或对照(PBS)治疗。用CT扫描仪测量骨密度。

[0202] 如图9所示,6周后相对于假手术对照,未治疗的切除卵巢的小鼠显示可观的小梁骨骨密度丢失。ActRIIa-mFc治疗将骨密度恢复到假手术小鼠的水平。在治疗6周和12周时,ActRIIa-mFc引起OVX小鼠小梁骨的可观增长。见图10。6周治疗后,相对于PBS对照,骨密度增加了24%。12周后,增加了27%。

[0203] 在假手术小鼠中,ActRIIa-mFc也引起了小梁骨的可观的增加。见图11。6周和12周后,相对于对照,治疗产生了35%的增加。

[0204] 在另外一组实验中,如上所述的切除卵巢(OVX)或假手术小鼠用ActRIIa-mFc(10mg/kg,每周两次)或对照(PBS)处理12周以上。类似于上述ActRIIa-mFc的结果,接受ActRIIa-mFc的OVX小鼠早在治疗4周时即显示小梁骨密度增加了15%,治疗12周后增加了25%(图12)。接受ActRIIa-mFc的假手术小鼠类似地早在治疗4周时即显示小梁骨密度增加了22%,治疗12周后增加了32%(图13)。

[0205] 用ActRIIa-mFc治疗12周后,全身以及离体股骨DEXA分析显示,治疗引起切除卵巢的和假手术小鼠的骨密度增加(分别为图14A和图14B)。这些结果也被股骨中段的离体pQCT分析所支持,证明了用ActRIIa-mFc治疗12周后,总的和皮质骨密度均显著增加。媒介处理的对照切除卵巢小鼠显示骨密度与媒介处理的对照假手术小鼠相当(图15)。除骨密度外,ActRIIa-mFc治疗后骨含量增加。股骨中段的离体pQCT54分析证明,用ActRIIa-mFc治疗12周后,总的以及皮质骨的骨含量均显著增加,而切除卵巢的和假手术媒介对照处理的小鼠显示相当的骨含量(图16)。股骨中段的离体pQCT分析还显示,ActRIIa-mFc治疗的小鼠没有显示骨外膜周长的变化,而ActRIIa-mFc治疗导致骨内膜周长减小,这表明皮质厚度的增加是由股骨内表面的生长引起的(图17)。

[0206] 股骨的力学测试确定了,ActRIIa-mFc能增加骨骼的外在特性(最大载荷、刚度以及断裂能),其有助于骨骼内在特性(极限强度)的显著增加。用ActRIIa-mFc治疗的去卵巢小鼠显示骨强度增加到超过假手术的、媒介处理对照的小鼠的水平,这表明骨质疏松表现型的完全逆转(图18)。

[0207] 这些数据证明,活化素-ActRIIa拮抗剂可增加正常雌性小鼠的骨密度,此外在骨质疏松小鼠模型中纠正骨密度、骨含量以及最终骨骼强度的缺陷。

[0208] 在另一组实验中,小鼠在4周时切除卵巢或假手术,在12周开始接受安慰剂或ActRIIa-mFc(每周两次,10mg/kg)(在图19-24中也被称作RAP-11),再进行12周。评价各种骨骼参数。如图19所示,ActRIIa-mFc增加OVX和SHAM手术小鼠的脊椎小梁骨体积与总体积之比(BV/TV)。ActRIIa-mFc还改善小梁骨结构(图20),增加皮质厚度(图21)并改善骨骼强度(图22)。如图23所示,1mg/kg至10mg/kg剂量范围的ActRIIa-mFc产生理想的效果。

[0209] 骨组织形态测量在假手术小鼠的2周时间点进行。图24中的这些数据证明ActRIIa-mFc具有双重作用,既抑制骨骼吸收又促进骨骼生长。因此ActRIIa-mFc刺激骨骼生长(合成代谢作用)并抑制骨骼吸收(抗分解代谢作用)。BV=骨体积;TV=总组织体积。BV/TV是矿化的骨体积百分比的量度标准。ES=侵蚀表面;BS=骨表面。ES/BS是骨侵蚀的量度标准,RAP-011所造成降低表明抗吸收或抗分解代谢作用。Ms/Bs是矿化表面/骨表面比,是骨骼生长或合成代谢作用的指示物。类似地,骨矿质接合速率(MAR)和每天每个骨表面的骨形成速率(BFR/BSd)表明骨骼生长。测量成骨细胞(Nob/BPm)和破骨细胞(Noc/BPm),探索作用的机理。

[0210] 第二次骨骼组织形态学测量实验在雌性C57BL/6小鼠中进行,12周龄时开始。小鼠腹腔内给药10mg/kg ActRIIa-mFc,每周两次,给药两周、四周、八周或十二周。每组最后给药之后五天处死,取骨骼进行分析。安乐死前,小鼠用钙黄绿素标记9天和2天。如图25所示,计量学表明ActRIIa-mFc促进骨骼生长和矿化,并具有合成代谢和抗分解代谢作用。参见例

如BV/TV比、ES/BS比和MS/BS比。合成代谢作用似乎持续整个给药方案,而抗吸收作用似乎在小鼠中存在时间短些。

[0211] 实施例3:ActRIIa-mFc减轻或预防鼠类多发性骨髓瘤鼠模型中的骨损伤

[0212] 多发性骨髓瘤患者表现出骨丢失疾病,以破骨细胞活性增加以及成骨细胞的骨形成减少为特征。小鼠骨髓瘤5T2MM模型是基于使用来自某种类型自发性肿瘤的肿瘤细胞(5T2MM细胞),该自发性肿瘤在老年小鼠中产生,并在小鼠中造成类似于在人多发性骨髓瘤患者中看到的那些作用。例如参见Vanderkerken et al., *Methods Mol Med.* 2005;113:191-205。检测ActRIIa-mFc在此模型中的作用。

[0213] 注射入C57Bl/KaLwRij小鼠的5T2MM细胞促进破骨细胞表面的增加,溶骨性病变的形成,并造成骨面积减少。骨骼疾病与成骨细胞数量、成骨细胞表面的减少和矿化减少有关。

[0214] 携带5T2MM细胞的小鼠用ActRIIa-mFc (RAP-011) (10mg/kg,腹膜内给药,每周两次)或媒介(vehicle)治疗,从5T2MM注射时开始,总共12周。胫骨近端和腰椎骨的MicroCT分析显示,与首次接受实验的小鼠相比,携带5T2MM的小鼠小梁骨体积降低39%和21% ($p < 0.001$ 和 $p < 0.01$),小梁骨数量降低37%和15% ($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$)。当与媒介治疗的小鼠比较时,RAP-011完全阻止了胫骨 ($p < 0.001$ 和 $p < 0.05$)和椎骨 ($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$)中松质骨体积和数量的5T2MM诱导的减少。当与首次接受实验的小鼠相比时,RAP-011治疗小鼠胫骨中骨体积高19% ($p = 168$),椎骨中高12% ($p < 0.05$)。RAP-011阻止溶骨性骨病变的发展 ($p < 0.05$)。此效果如图26所示。虽然在此研究中,数据的初步评估没有确定对血清病变蛋白(多发性骨髓瘤肿瘤细胞的生物标志物)或骨髓瘤负荷有显著影响,但进一步的分析表明,除一只治疗动物外全部治疗动物的血清病变蛋白都大大降低,此外,健康骨髓的量大幅增加,表明骨髓瘤肿瘤细胞负荷减少。

[0215] 因此,ActRIIa-mFc可用于减少多发性骨髓瘤所致的骨骼疾病的影响,并治疗肿瘤细胞本身。

[0216] 实施例4:ActRIIa-hFc蛋白的鉴定

[0217] 采用组织血纤维蛋白溶酶原前导序列SEQ ID NO:9,ActRIIa-hFc融合蛋白在pAID4载体(SV40 ori/增强子,CMV启动子)稳定转染的CHO-DUKXB11细胞中表达。如上述实施例1中纯化的蛋白的序列为SEQ ID NO:7。Fc部分是人IgG1 Fc序列,如SEQ ID NO:7所示。唾液酸分析表明,所述蛋白质中含有平均每分子ActRIIa-hFc融合蛋白约1.5至2.5摩尔的唾液酸。

[0218] 此纯化的蛋白显示在所有检测动物中非常长的血清半衰期,包括在人类患者中有25-32天的半衰期(见下面实施例6)。另外,CHO细胞表达的物质对活化素B配体比报道的对人293细胞中表达的ActRIIa-hFc融合蛋白有更高的亲和力(del Re et al., *J Biol Chem.* 2004Dec 17;279(51):53126-35.)。另外,使用tPa前导序列比其他前导序列生成的更多,并且不像用天然前导序列表达的ActRIIa-Fc那样,提供了高纯度的N末端序列。使用天然前导序列得到两种主要种的ActRIIa-Fc,每个有不同的N末端序列。

[0219] 实施例5:人临床试验

[0220] 实施例5中描述的蛋白在随机、双盲、安慰剂对照的研究中给予人类患者,进行该研究主要是为了评价所述蛋白在健康的绝经后女性中的安全性。48个对象随机分为6个组

群,接受或者单剂量的ActRIIa-hFc或者安慰剂(5个活性的:1个安慰剂的)。剂量水平的范围从0.01至3.0mg/kg静脉注射(IV)以及0.03至0.1mg/kg皮下注射(SC)。所有对象随访120天。如果对象在6个月的研究入围中使用了影响骨骼代谢的药物,则被排除而不参与研究。对每个组群进行安全性评价,确定剂量逐步上升。除了药物代谢动力学(PK)分析外,ActRIIa-hFc的生物活性还通过测量骨形成和吸收的生化标志物以及FSH水平进行评估。

[0221] 在此研究中未见严重不良反应报道。不良事件(AEs)一般是轻微和短暂的。对AEs的初步分析包括头痛、化验值升高、感冒症状、呕吐(emesi s)或呕吐(vomiting)、静脉内浸润以及注射部位血肿。

[0222] ActRIIa-hFc的PK分析显示剂量的线性曲线图,平均半衰期为约25-32天。ActRIIa-hFc的曲线下面积(AUC)与剂量线性相关,SC给药后吸收基本完全(见图27和28)。这些数据表明,SC是可取的给药办法,因为它提供药物的生物等效性和血清半衰期,同时避免静脉给药头几天相关的药物血清浓度峰值(见图28)。ActRIIa-hFc造成合成代谢骨骼生长标记物骨特异性碱性磷酸酯酶(BAP)血清水平的快速持续的剂量依赖性增加,以及骨吸收标记物C末端1型胶原端肽和抗酒石酸酸性磷酸酶5b水平的剂量依赖性降低。其他标记物如P1NP显示不确定的结果。BAP水平显示在药物最高剂量时接近饱和效应,表明在剂量0.3mg/kg时实现对此合成代谢骨骼生物标志物的半数最大效应,增加的变化最高达3mg/kg。药物的药效学作用和AUC之间的关系推算EC₅₀为51,465(天*ng/ml)。见图29。在检测的最高剂量水平,这些骨生物标志物的变化持续大约120天。也有与活化素抑制相一致的血清FSH水平的剂量依赖性降低。对0.10mg/kg至高达3mg/kg剂量范围内的ActRIIa-hFc观察到FSH水平的明显降低。1和3mg/kg剂量观察到FSH水平30-40%的降低,对3mg/kg剂量的个体患者观察到相对于基线高达50%的FSH降低。应注意到,绝经后女性显示出相对恒定的升高的FSH水平,使得相对容易观察到药物对FSH的作用。在男性和生育活跃的女性中,基线FSH水平可变化较大,难以评估具体的抑制程度,但是,活化素-FSH信号转导轴在这些个体中是完整的,预期ActRIIa-hFc将显著抑制FSH的产生,即使难以定量FSH在这些群体中的作用。计算为药代动力学作用与药物对FSH的作用的AUC的关系,EC₅₀约为250,000(day*ng/ml)。参见图32

[0223] 给予健康绝经后女性的单剂量ActRIIa在检测的剂量水平范围是安全和良好耐受的。长期的PK和药效学作用表明,间歇性给药对未来研究是合适的。举例来说,基于血清半衰期的给药可按每月一次,或按每二、三、四、五或六周一度的程度进行。另外,由于药效学作用的影响远远超出了药物的血清残留,给药可以基于药效学作用进行,意味着每三个月给药一次,或每二、三、四、五、六甚至12个月给药一次都可能对患者产生所需效果是有效的。此临床试验表明,对人而言ActRIIa-hFc是有骨形成增加和骨吸收减少的生物学证据的骨合成代谢(osteoblastic)药物。

[0224] 实施例6:ActRIIa-mFc和双磷酸盐的联合用药

[0225] 双磷酸盐是一类广泛用于治疗与低骨矿密度相关的疾病,包括骨质疏松症和癌症有关的骨流失的药物。双磷酸盐具有很强的抗骨吸收活性,抑制破骨细胞。可能因为骨破裂和骨骼生长都需要破骨细胞,双磷酸盐似乎减少作为最近已知合成代谢骨骼生长药物之一的甲状旁腺激素(PTH)的作用(Black et al., N Engl J Med. 2003 Sep 25; 349(13):1207-15; Samadfam et al., Endocrinology. 2007 Jun; 148(6):2778-87.)。

[0226] 为检测ActRIIa治疗对之前或同时接受双膦酸盐或其他抗吸收治疗的患者的效用,用组合的ActRIIa-mFc和双膦酸盐化合物唑来膦酸对小鼠进行了测试。12周龄的C57BL/6N小鼠作如下处理:

[0227] 组1PBS

[0228] 组2ActRIIa-mFc (RAP-011) (10mg/kg) 每周两次 (与组3和4一起)

[0229] 组3唑来膦酸 (ZOL) 单剂量 (20mg/kg)

[0230] 组4ZOL (1剂量), 三天后ActRIIa-mFc (RAP-011) (1mg/kg) 每周两次

[0231] 组5ZOL (1剂量), 三天后ActRIIa-mFc (RAP-011) (10mg/kg) 每周两次

[0232] 给药前和治疗3和8周时,总BMD通过DEXA扫描 (PIXI) 测定。

[0233] 如图30所示,总BMD在所有治疗组中显著增加,ZOL和ActRIIa-mFc的组合产生最大效用。这些结果表明,ActRIIa-Fc蛋白可用于增加骨密度,甚至是在已经接受双膦酸盐治疗的患者中。

[0234] 实施例7:可选择的ActRIIa-Fc蛋白

[0235] 可根据本文描述的方法使用的多种ActRIIa变体描述于国际专利申请公开号W02006/012627 (参见例如pp.55-58),全文通过参考纳入本文。可选择的构建物可能有C末端尾部的缺失 (ActRIIa胞外结构域的最后15个氨基酸)。这样的构建物的序列如下 (Fc部分加下划线) (SEQ ID NO:12):

[0236] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP
IEKTIISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0237] 通过参考纳入本文

[0238] 本文所提到的所有出版物和专利特此全部引作参考,好像每个出版物或专利明确且单独地表明引作参考。

[0239] 尽管已经讨论过目标事物的具体实施例,但是以上说明书是举例说明性的而非限制性的。通过阅读此说明书和下面的权利要求,许多变化对于本领域技术人员而言是显而易见的。本发明全部范围应当参照权利要求及其等同的全部范围,和本说明书及这样的变化确定。

序列表

<110> 阿塞勒隆制药公司(Acceleron Pharma Inc.)

KNOFF, JOHN

SEEHRA, JASBIR

SHERMAN, MATTHEW L.

<120> 活化素-ACTRIIA拮抗剂和减少或抑制FSH分泌的用途

<130> PHPH-028-W01

<140> PCT/US08/010868

<141> 2008-09-17

<150> 60/994,399

<151> 2007-09-18

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1           5           10           15
Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
           20           25           30
Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
           35           40           45
Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
           50           55           60
Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
65           70           75           80
Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
           85           90           95
Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
           100          105          110
Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
           115          120          125
Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
           130          135          140
Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
145          150          155          160

```

Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln
 165 170 175
 Asp Pro Gly Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu
 180 185 190
 Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys
 195 200 205
 Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln
 210 215 220
 Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly
 245 250 255
 Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys
 260 265 270
 Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
 275 280 285
 Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
 290 295 300
 Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
 305 310 315 320
 Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
 325 330 335
 Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
 340 345 350
 Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro
 355 360 365
 Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg
 370 375 380
 Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg
 385 390 395 400
 Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu
 405 410 415
 Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val
 420 425 430
 Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
 435 440 445
 Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
 450 455 460
 Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr

50	55	60	
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val			
65	70	75	80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr			
	85	90	95
Phe Pro Glu Met			
	100		
<210> 4			
<211> 1542			
<212> DNA			
<213> 智人			
<400> 4			
atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgc gtetttetta tctctgttc ttcaggtgct			60
atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaagac			120
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt			180
tttgetacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg			240
gatgatataca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta			300
tatTTTTgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg			360
gaagtcaaac agcccacttc aaatccagtt acacctaage caccctatta caacatcctg			420
ctctattcct tgggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg			480
tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtaettgttc caactcaaga cccaggacca			540
ccccacctt ctccattact agggttgaaa ccaactgcagt tattagaagt gaaagcaagg			600
ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata			660
ttccaatac aggacaaaca gtcattgcaa aatgaatacg aagtctacag tttgcctgga			720
atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat			780
gtggatcttt ggctgatcac agcatttcatt gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag			840
gctaattgtg tctcttgtaa tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg			900
gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaactgc catatctcac			960
agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac			1020
tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgatacca tggacaggtt			1080
ggtaccggga ggtacatggc tcagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaagggat			1140
gcatttttga ggatagatat gtatgcatg ggattagtec tatgggaact ggcttctcgc			1200
tgtactgctg cagatggacc thtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc			1260
cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctggt			1320
ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa			1380
tgttgggatc acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc			1440
cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg			1500
gtgacaaatg ttgacttcc tcccaaagaa tctagtctat ga			1542
<210> 5			

<211> 345
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 5
 atacttggta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
 agaaccaatc aaactgggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggctg 180
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaage caccc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43) .. (43)

<223> Asp 或 Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (100) .. (100)

<223> Lys 或 Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (212) .. (212)

<223> Asn 或 Ala

<400> 6

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95
Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
100 105 110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175
Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
180 185 190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205
Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

Lys

225

<210> 7

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成构建物

<400> 7

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15
Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30
Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45
Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110
 Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340
 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 蜜蜂(*Apis mellifera*)
 <400> 8
 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:组织纤溶酶原激活肽

<400> 9

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Ala Val Phe Val Ser Pro

20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: 原始肽

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys

1

5

10

15

Ser Ser Gly Ala

20

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu

1

5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的构建物

<400> 12

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
225	230	235	240
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys			
	245	250	255
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	260	265	270
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	275	280	285
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	290	295	300
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
305	310	315	320
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	325	330	335
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	340	345	350
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	355	360	365

Lys

<210> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的构建物

<400> 14

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta	120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata	180
aacggcggca ttgttttget acctggaaga atattttctgg ttccattgaa tagtgaaaca	240
aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga	300
cagccctgaa gtatatcttct gttgctgtga gggcaatag tgtaatgaaa agttttctta	360
ttttccggag atggaagtca cacageccac ttcaaateca gttacaccta agccaccac	420
cggtggtgga actcacacat gcccaccgtg cccagcact gaactctggt ggggaccgtc	480
agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt	540
cacatgcgtg gtggtggaag tgagccacga agacctgag gtcaagttea actggtacgt	600
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac	660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta	720
caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agtcccctc gagaaaacca tctccaaagc	780

caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgecc ceatcccggg aggagatgac 840
 caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggette tateccagcg acatcgccgt 900
 ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
 ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
 ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
 gagcctctcc ctgtctccgg gtaaattgaga attc 1114

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 15

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的6xHis标签

<400> 17

His His His His His His

1 5

<210> 18

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 18

agccagacaa gccagacaag ccagacaagc cagacaagcc agacaagcca gacaagccag 60

acaagccaga caagccagac aagccagaca agccagacaa gccagaca 108

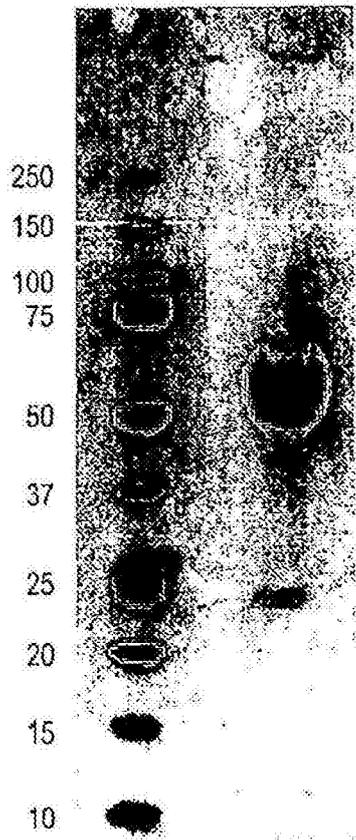
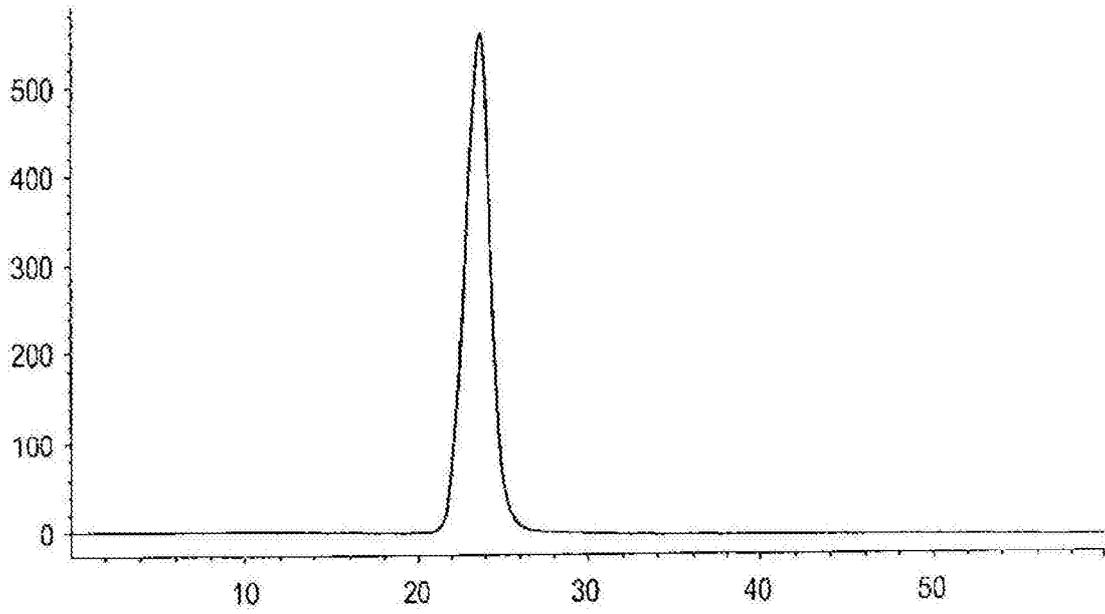


图1

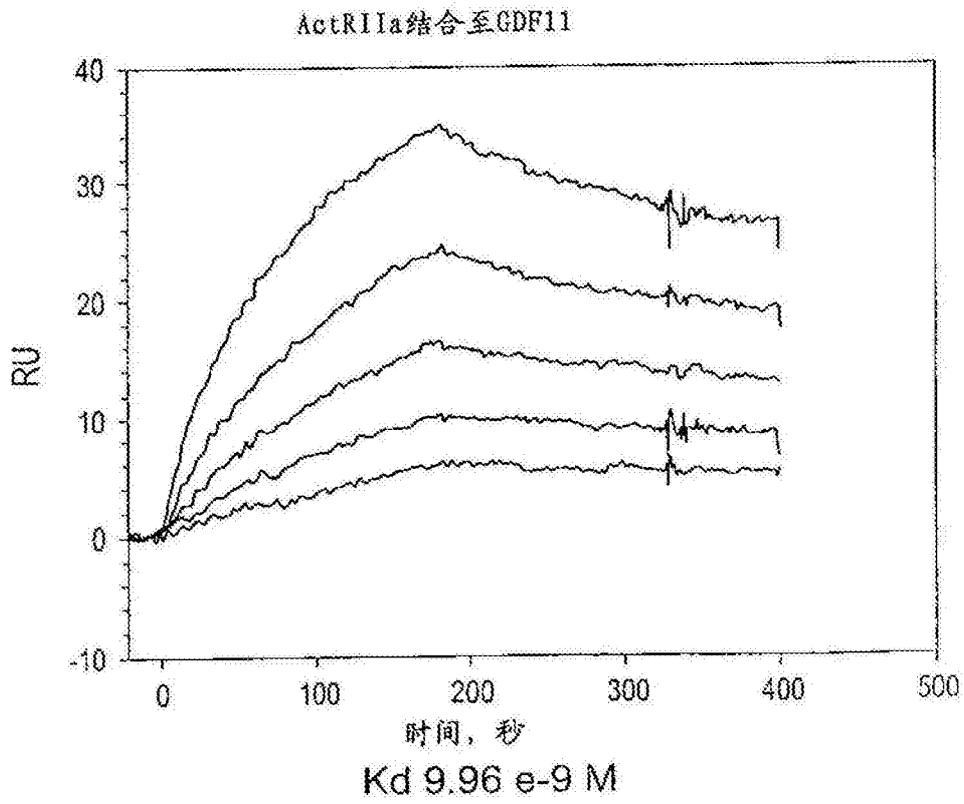
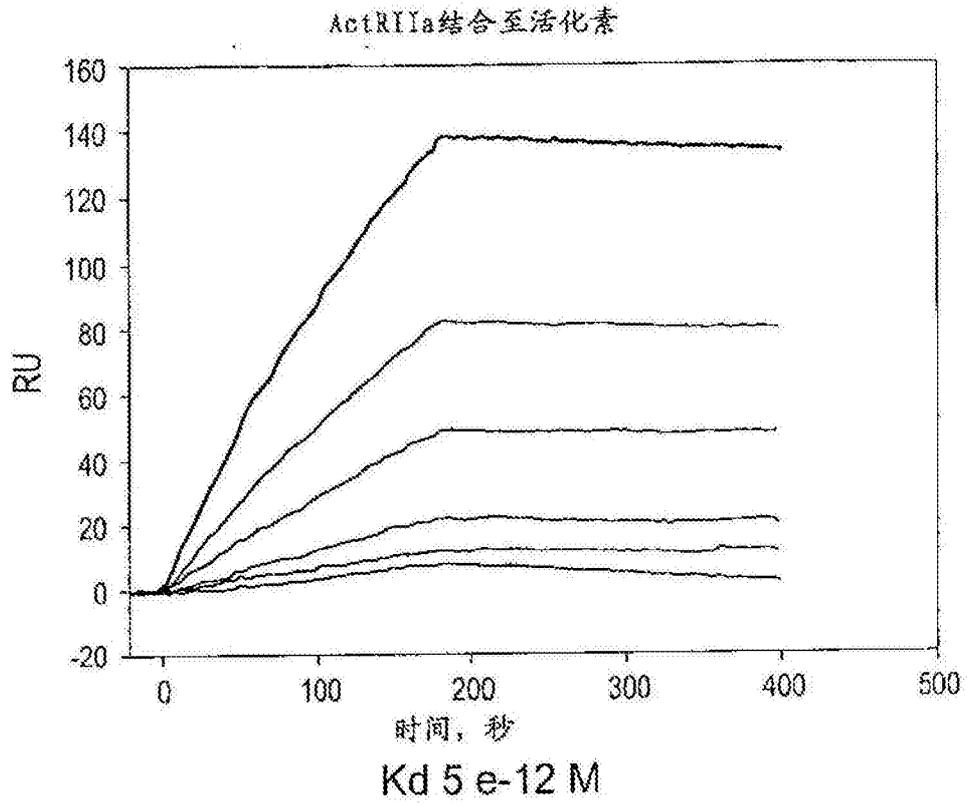
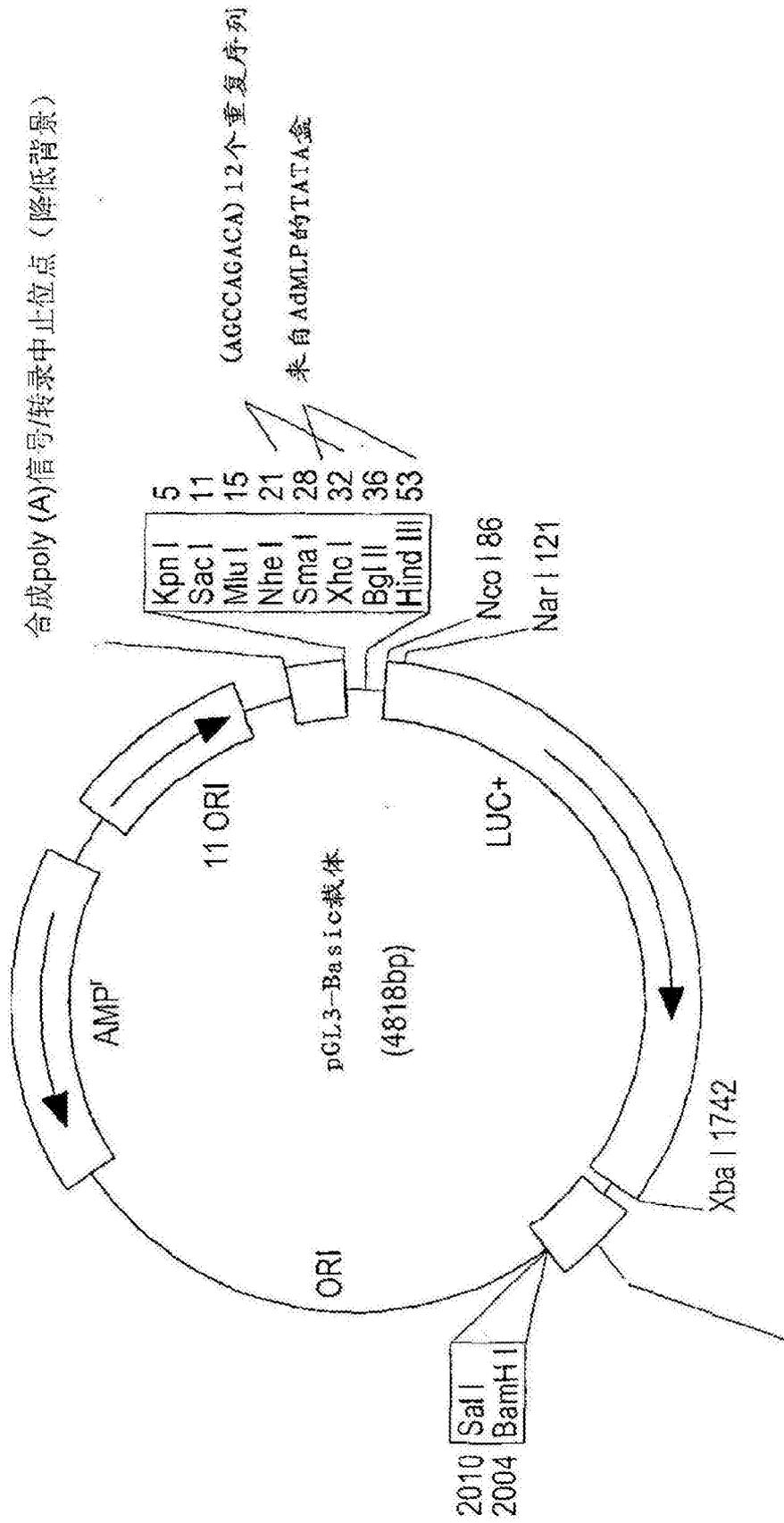


图2



SV40晚期poly (A) 信号 (luc+报道基因) Bpa11902

图3

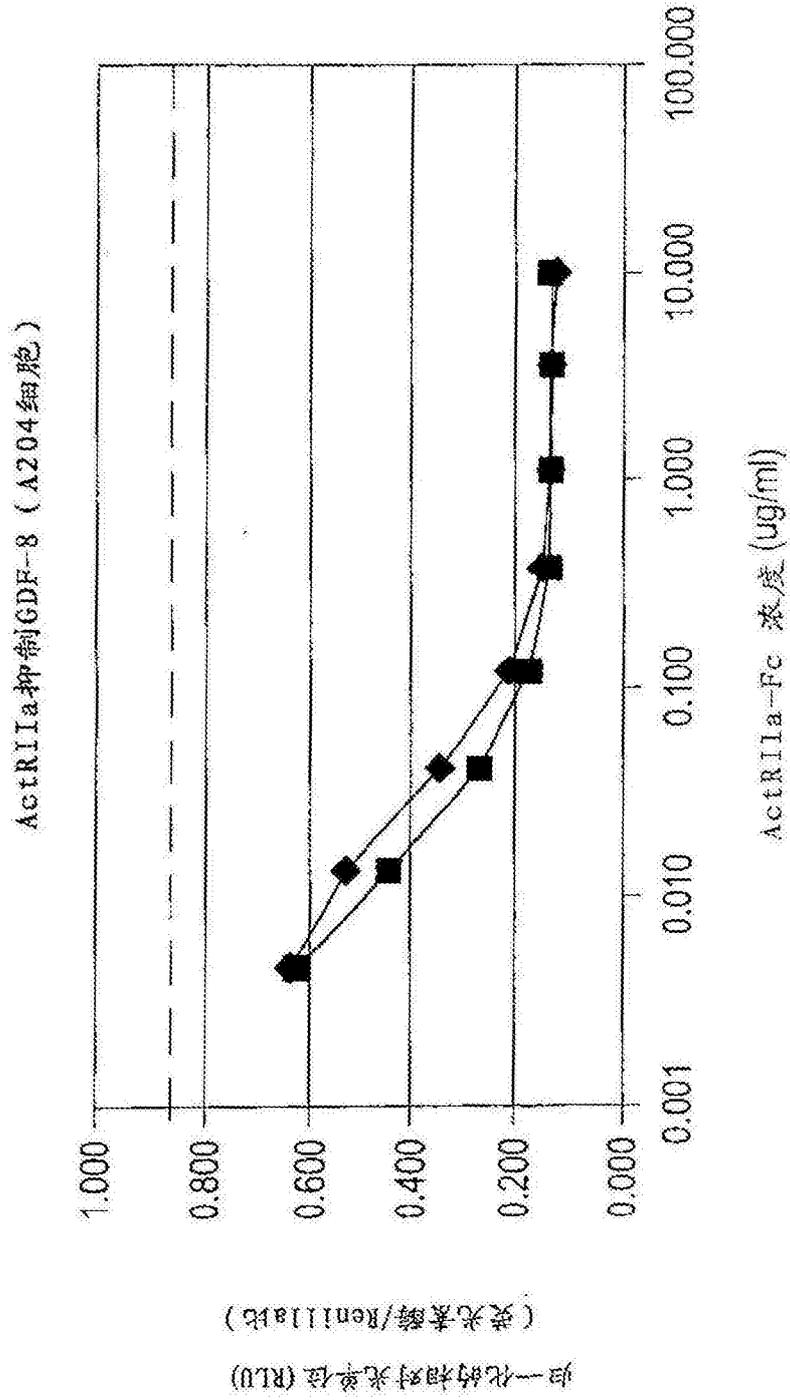


图4

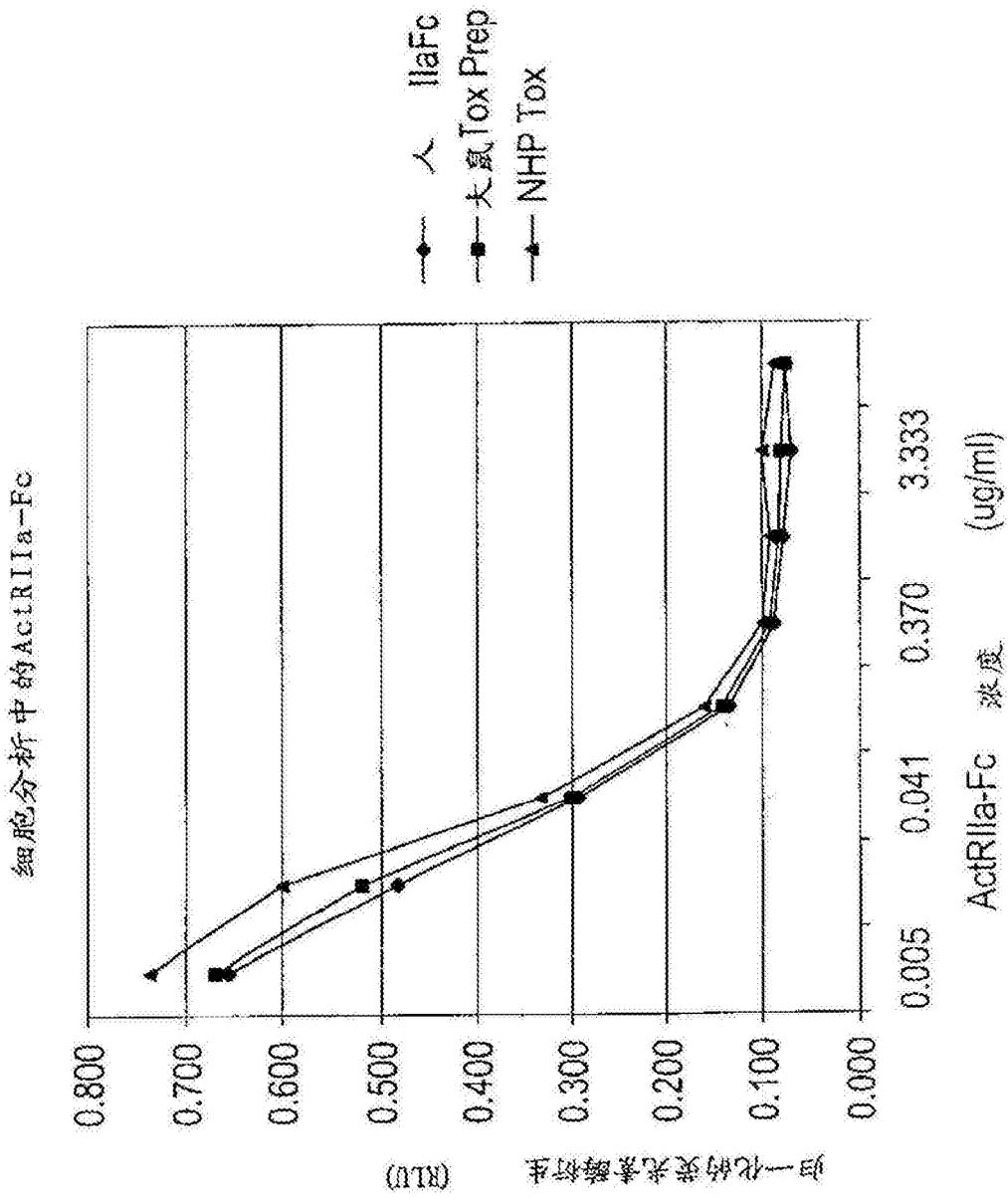


图5

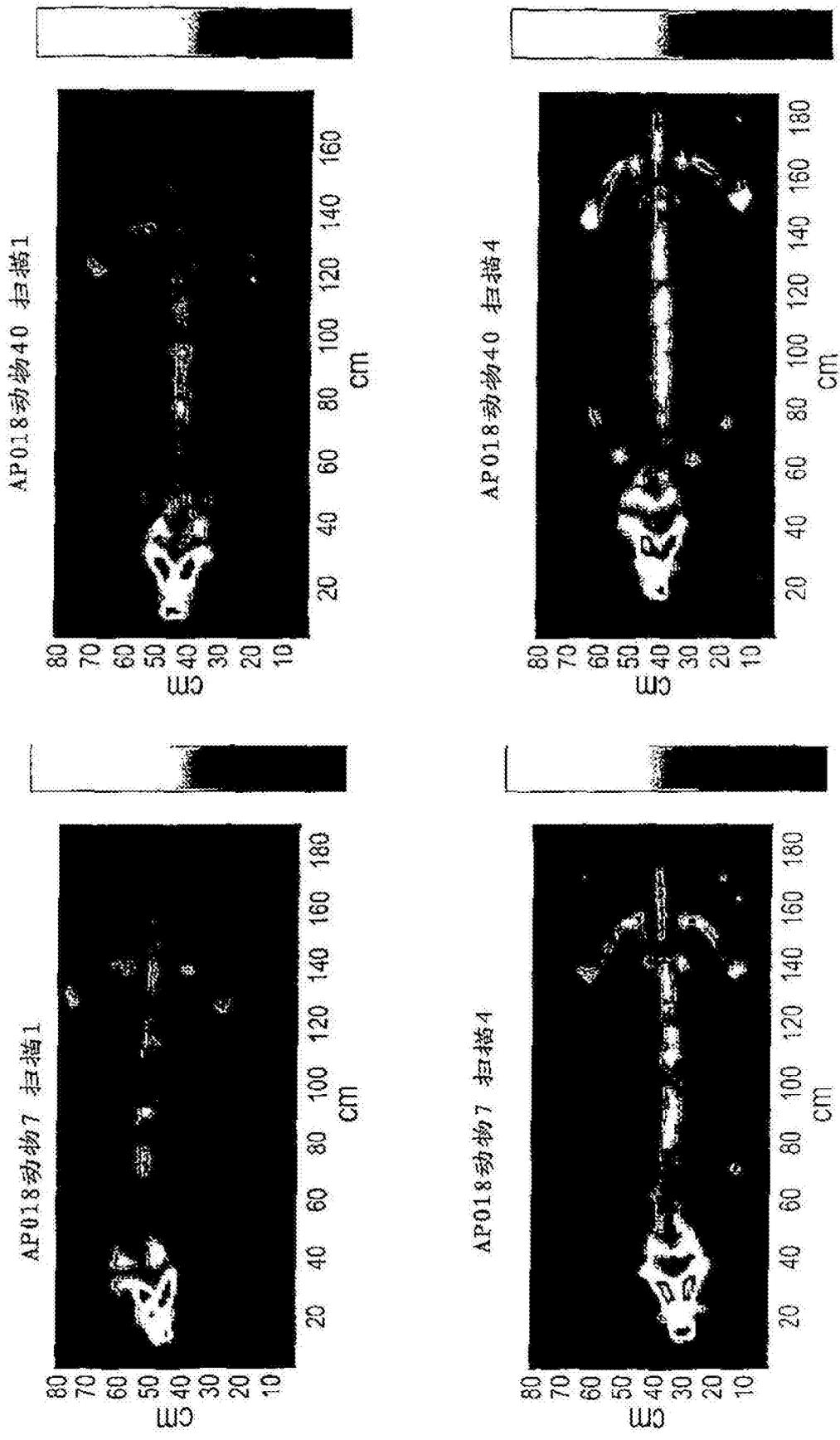


图6

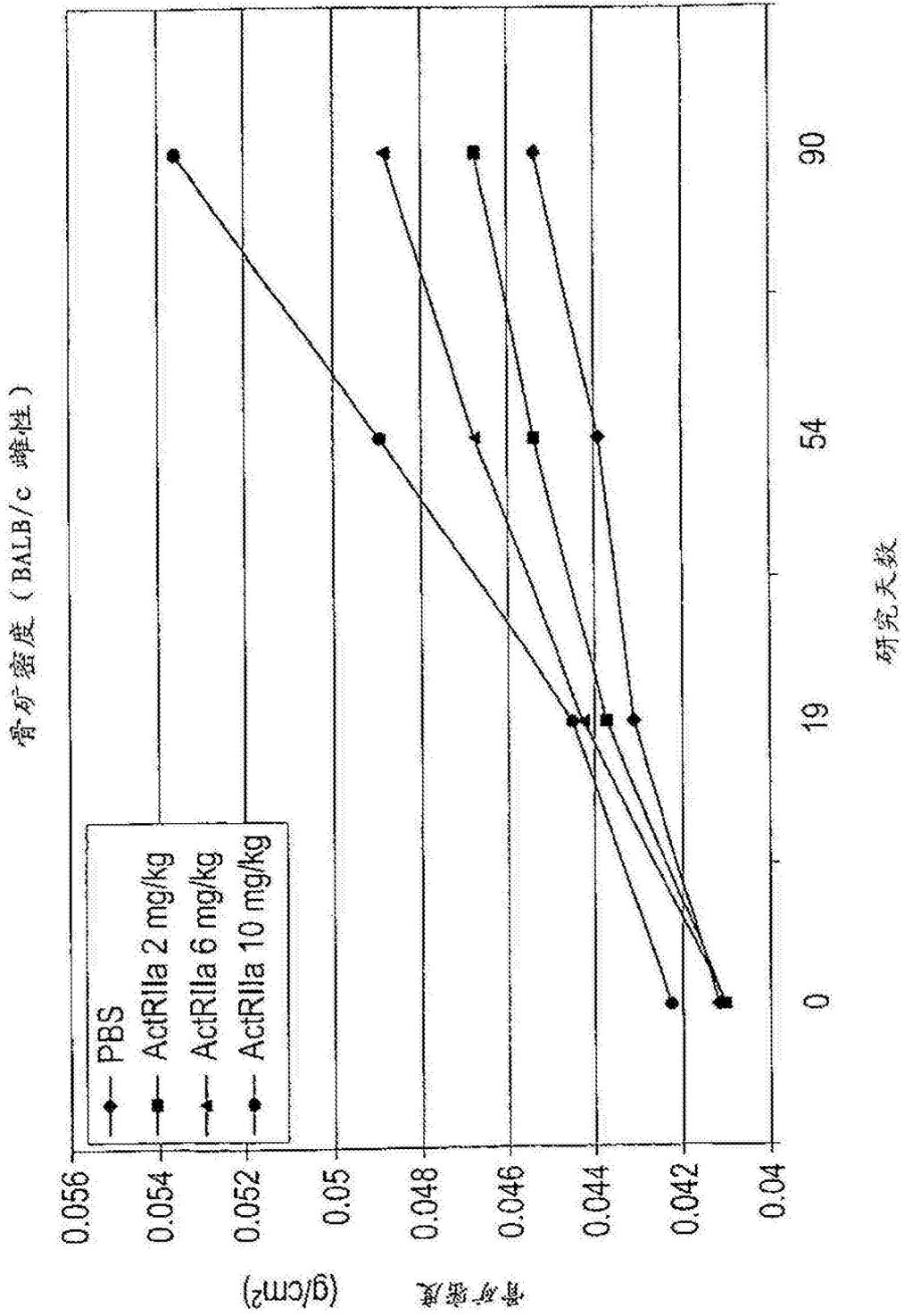


图7

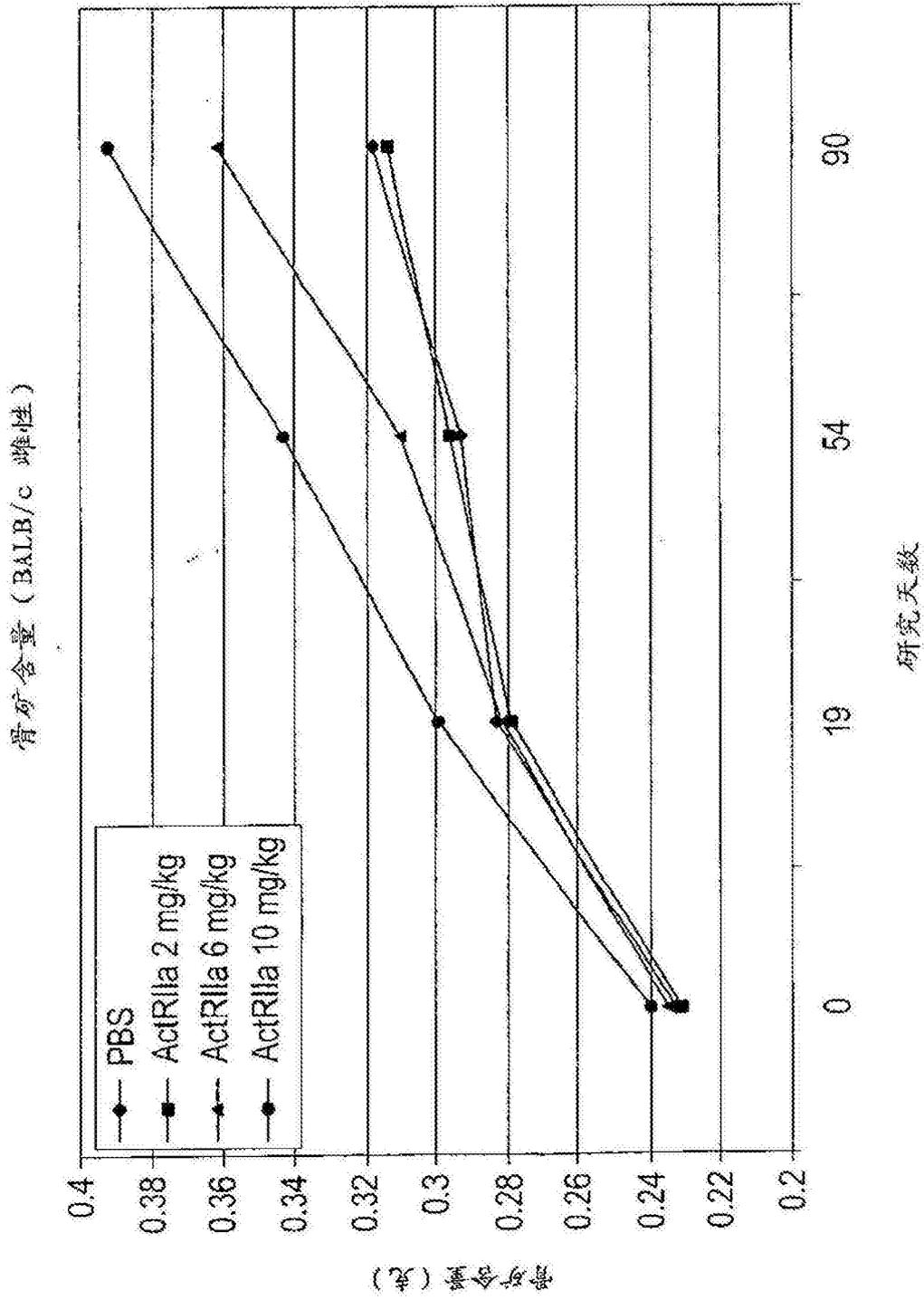


图8

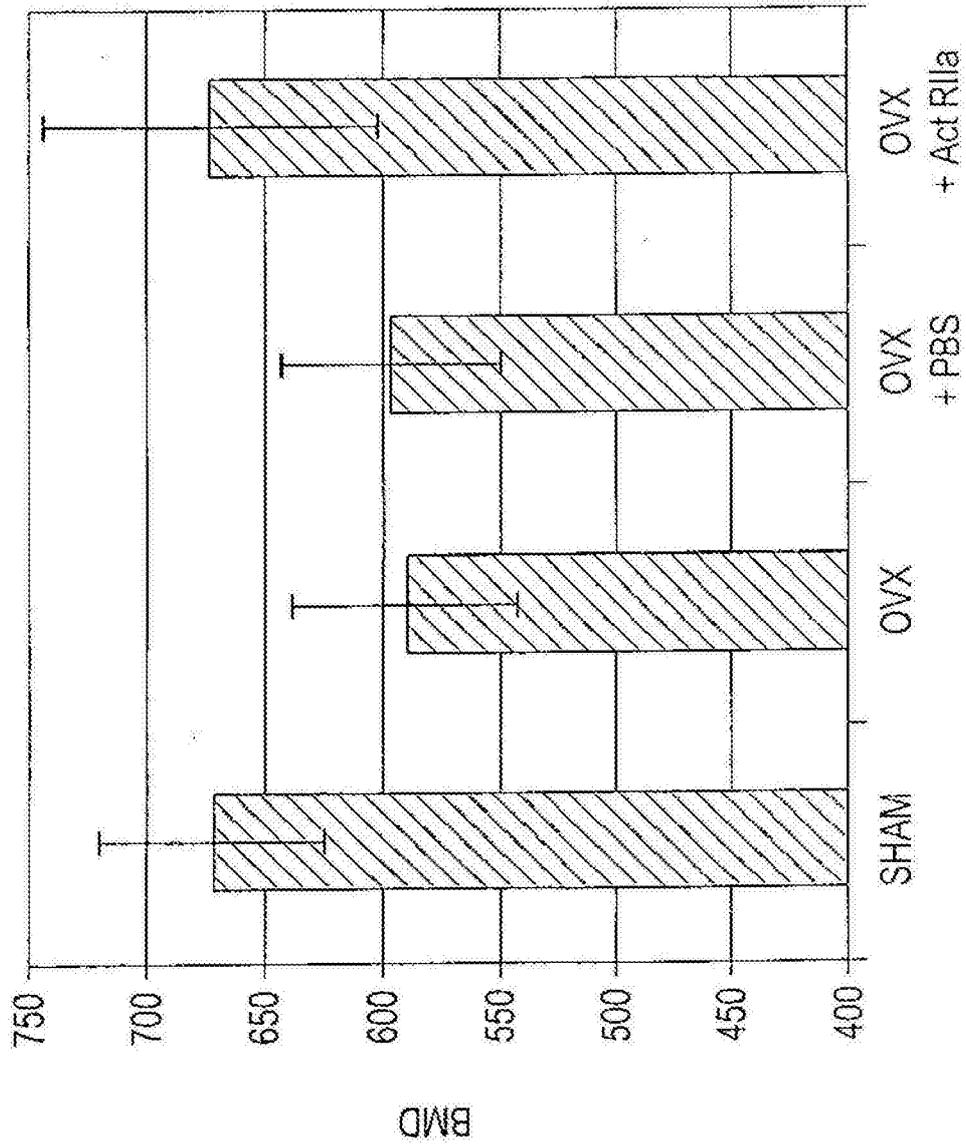


图9

小梁骨 (切除卵巢C57BL/6)

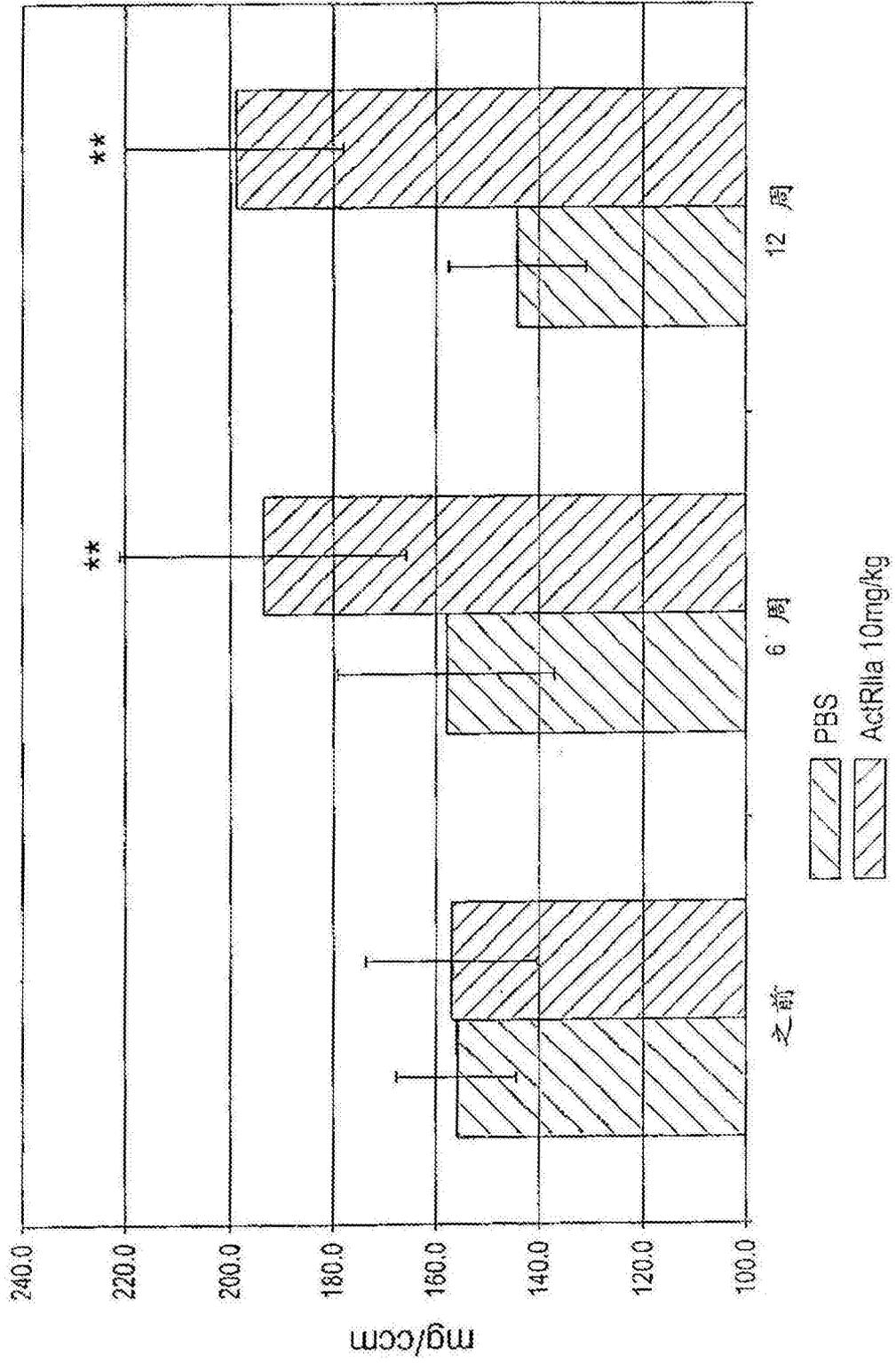


图10

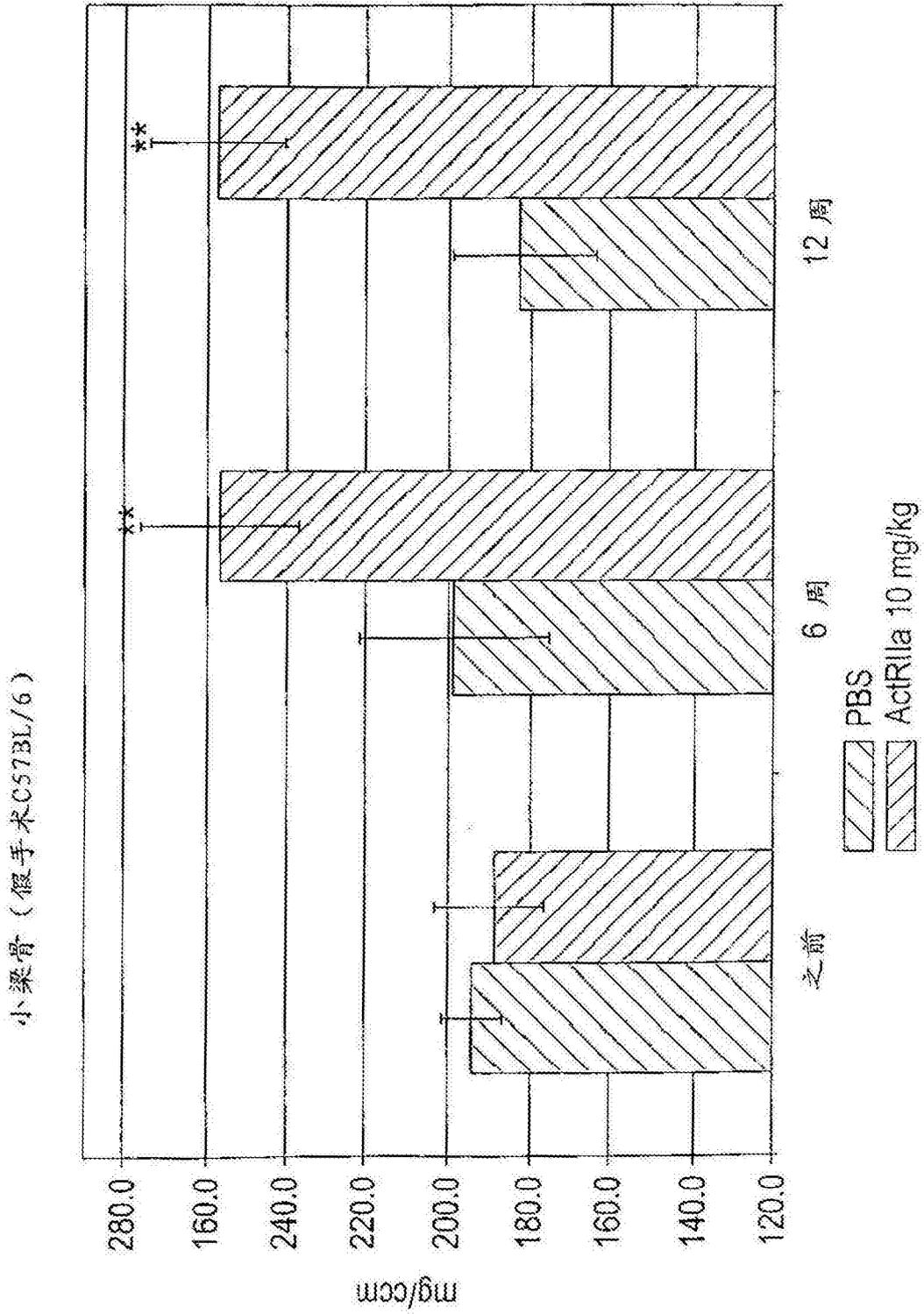


图11

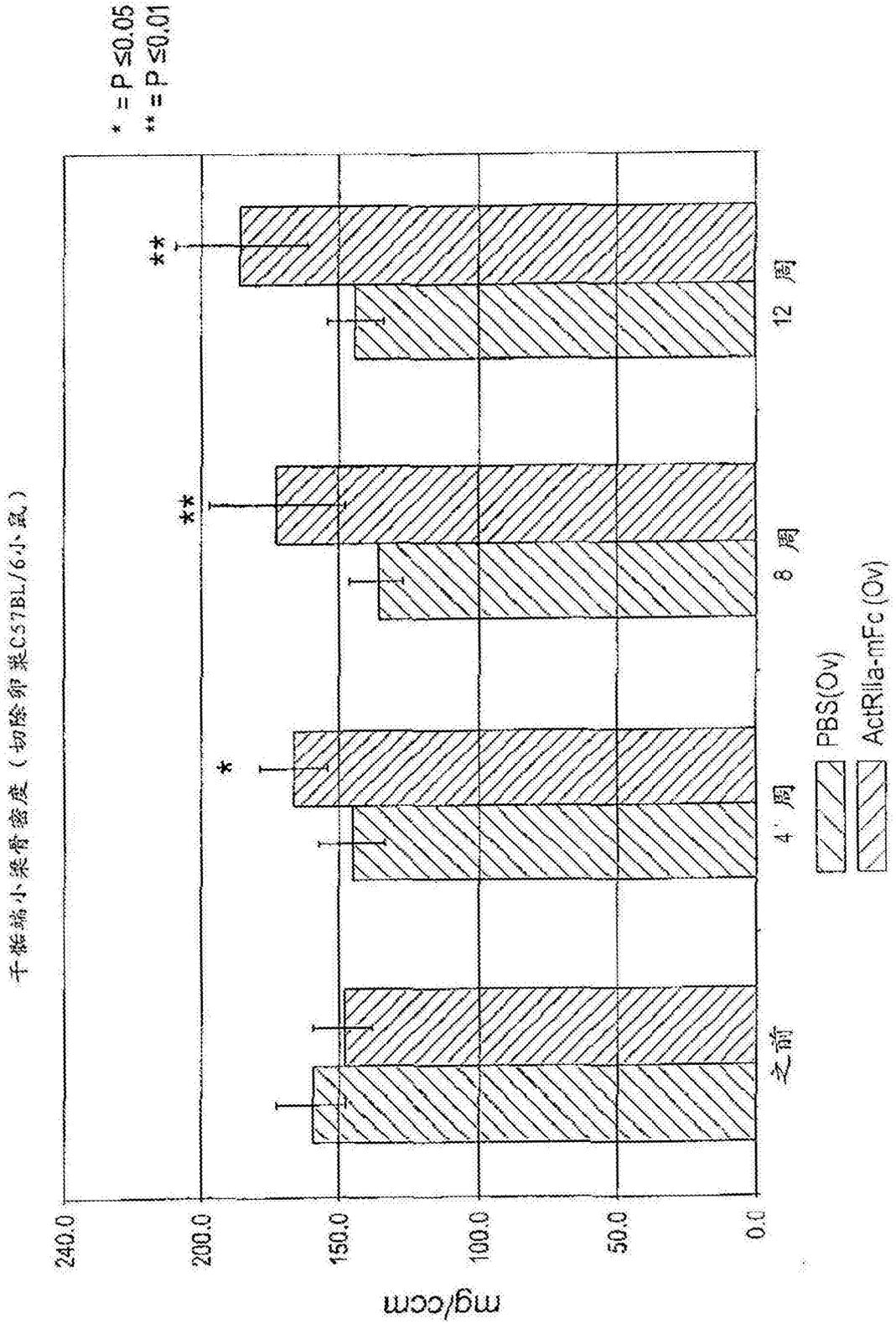


图12

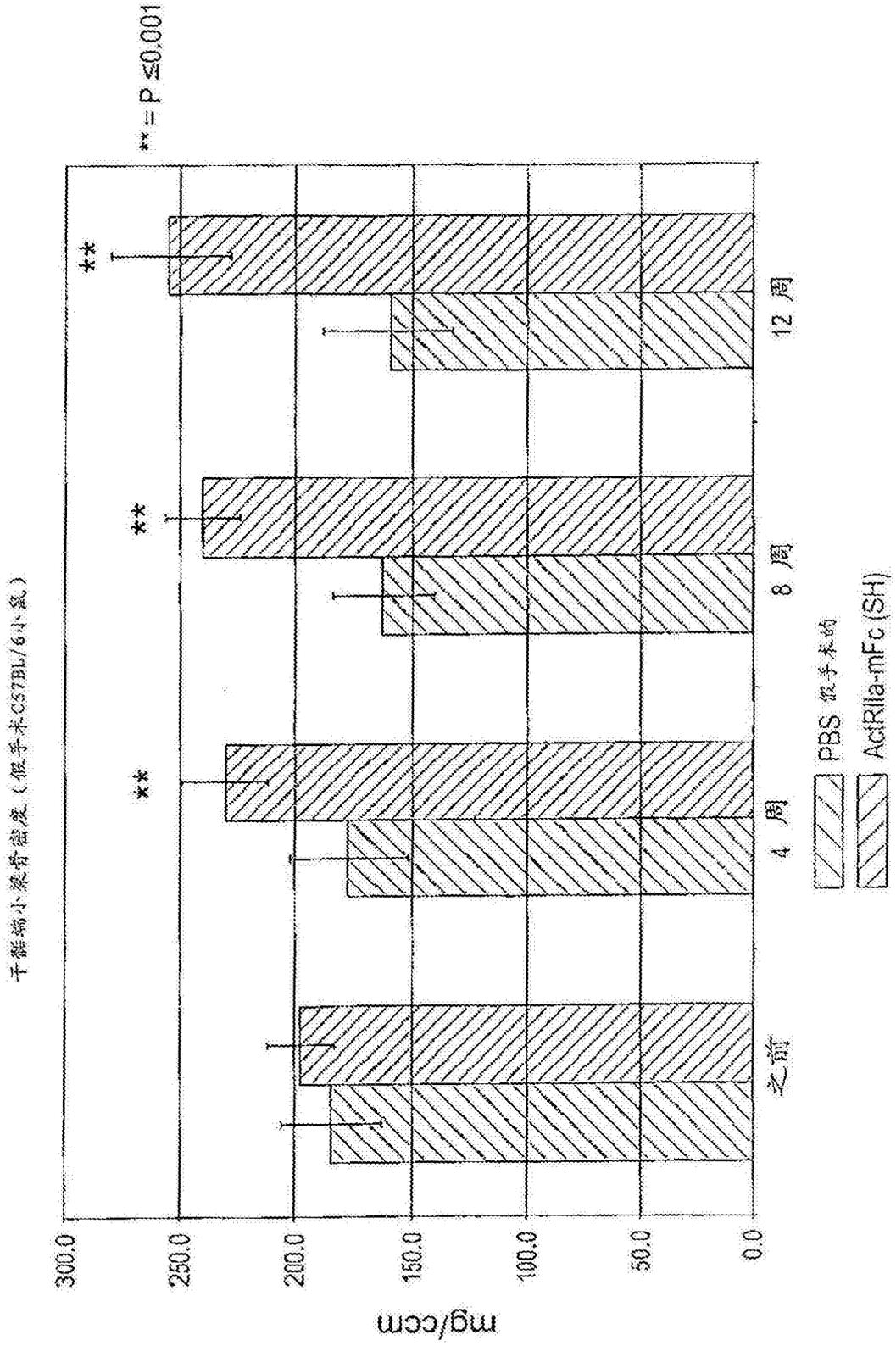
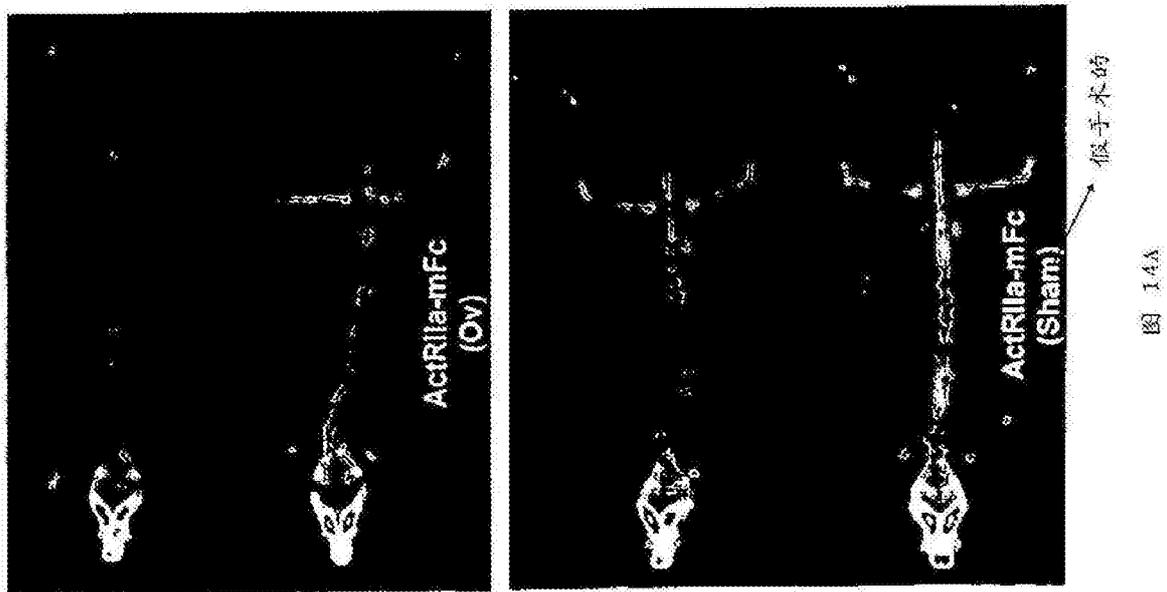
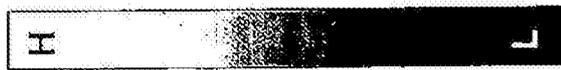
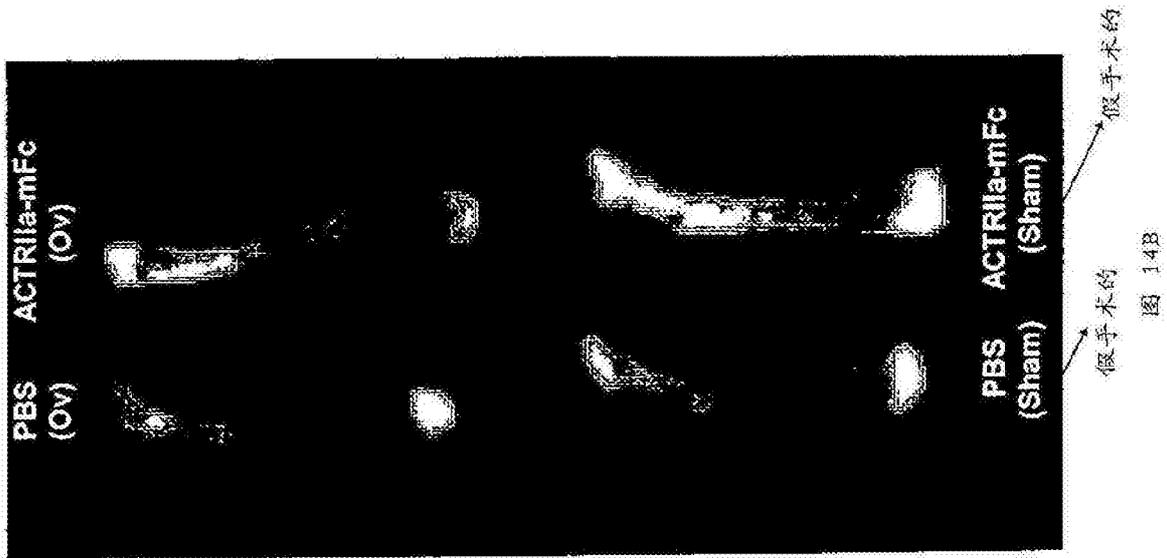


图13



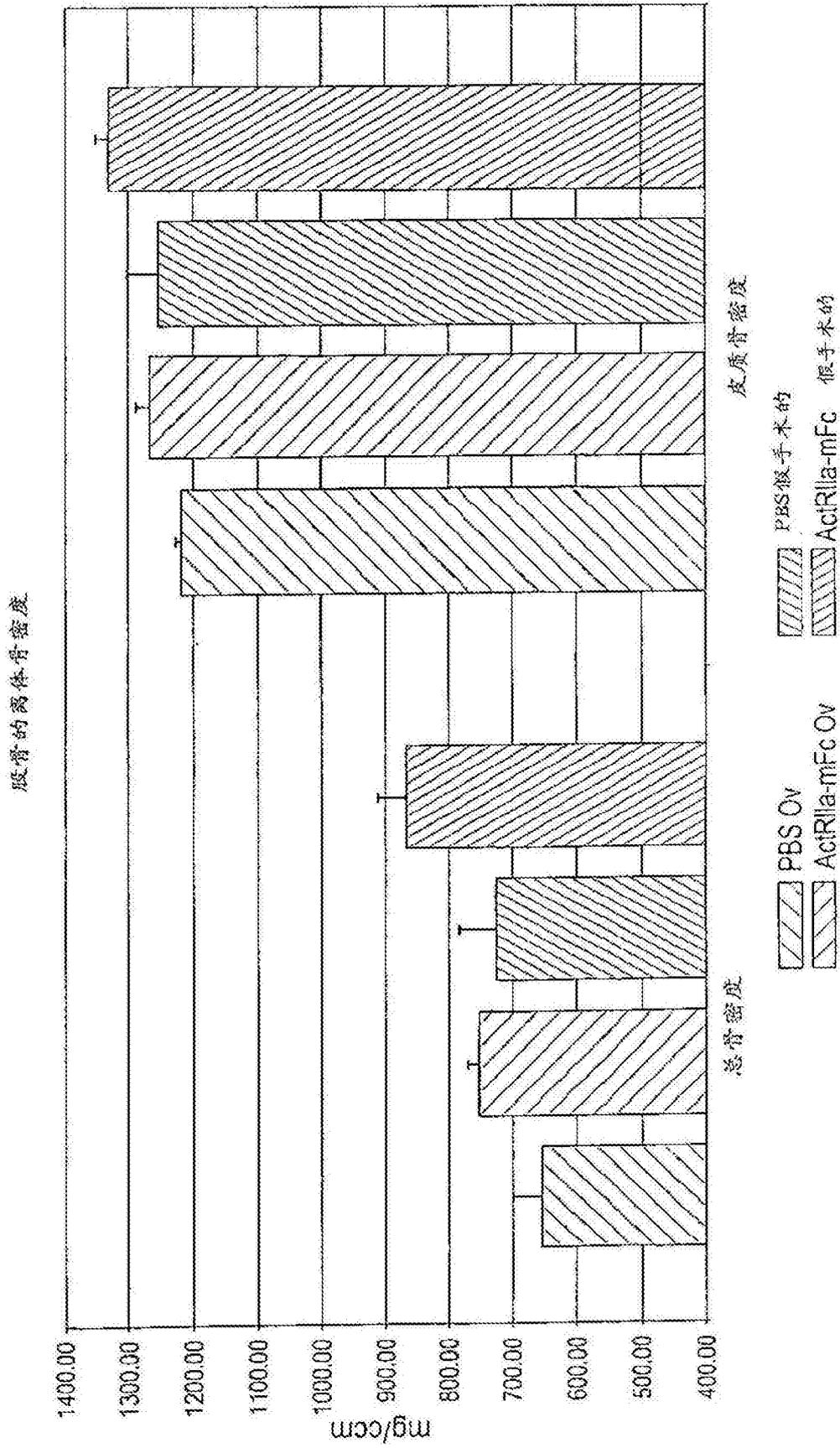


图15

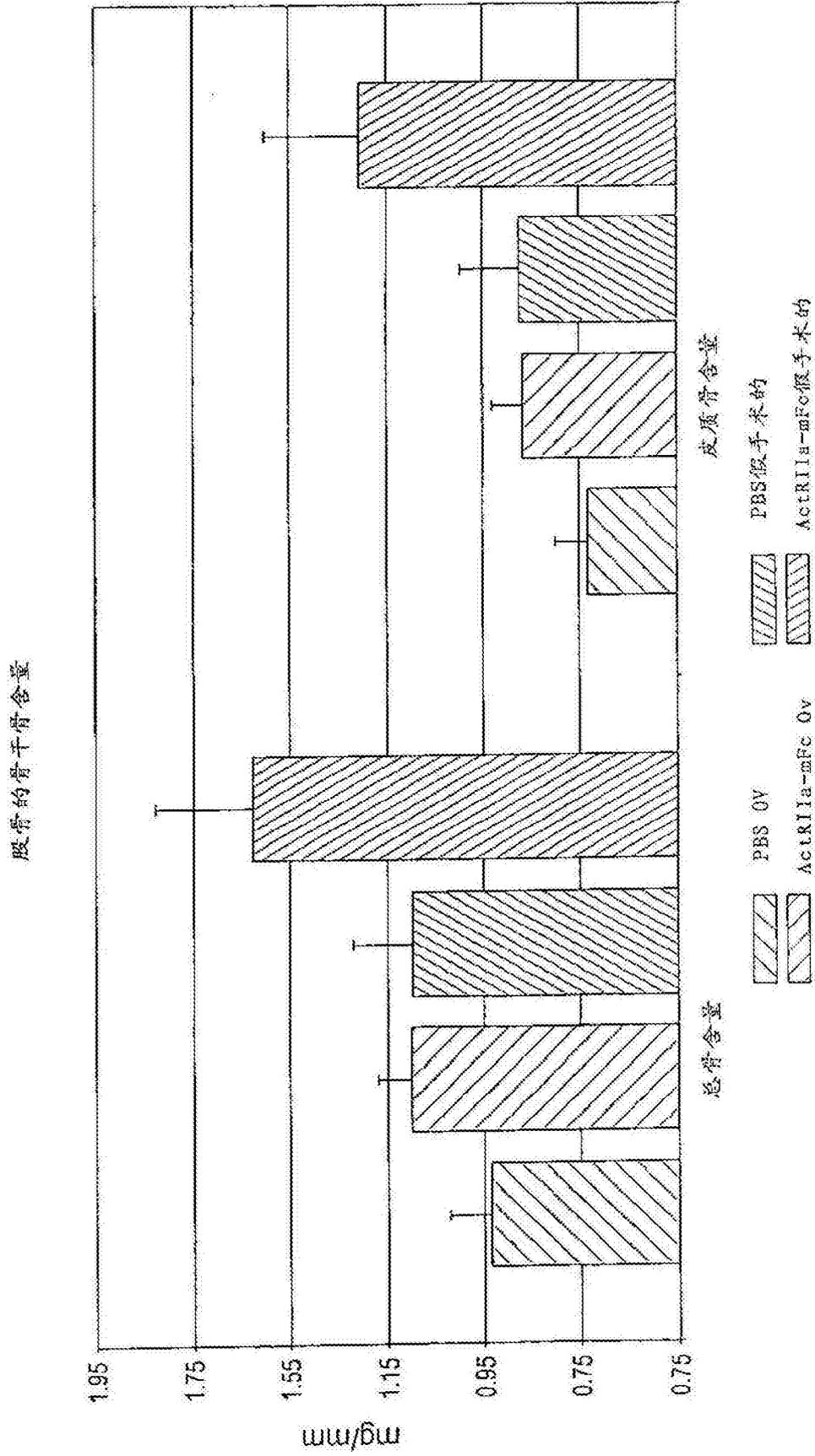


图16

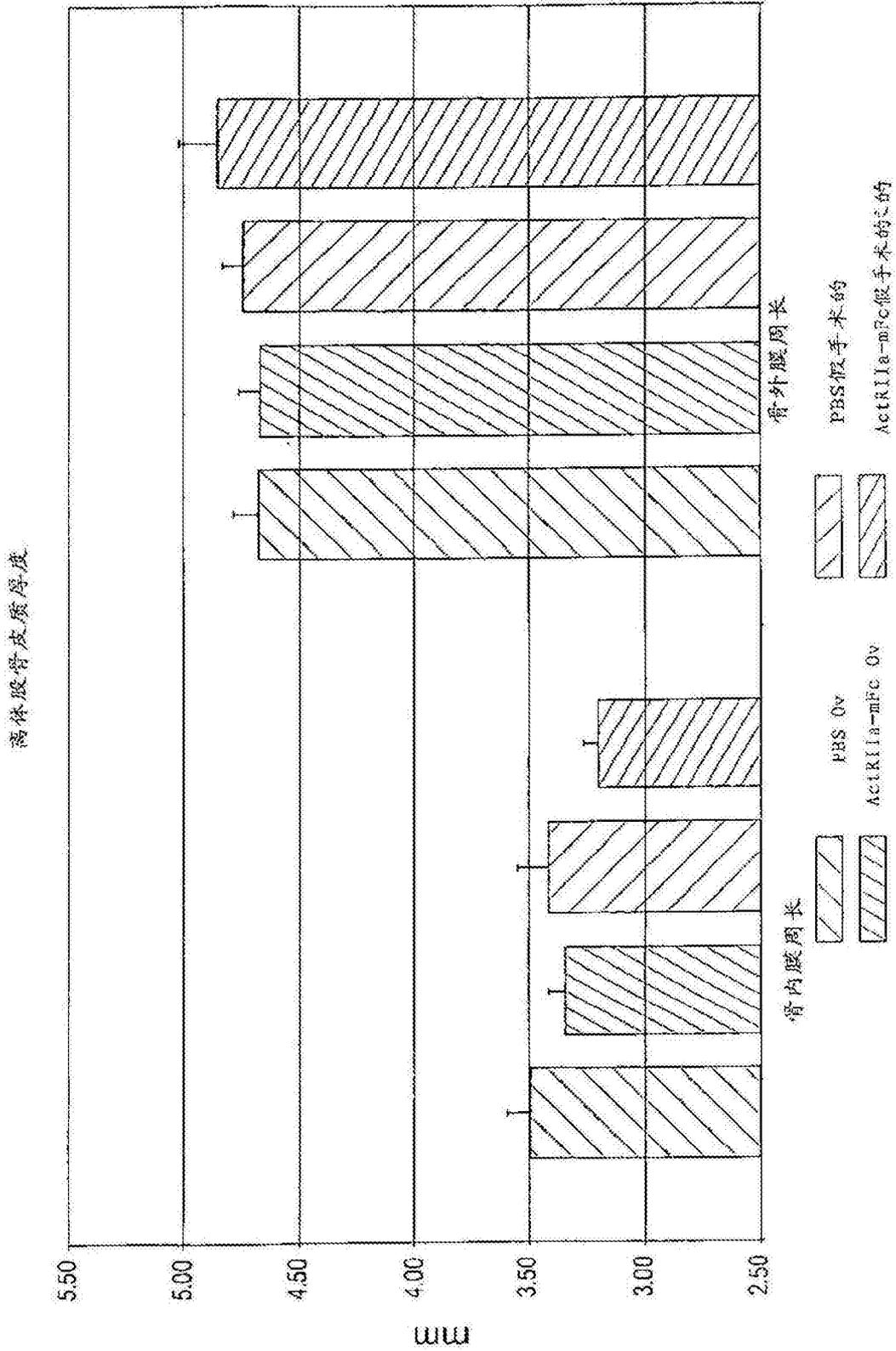


图17

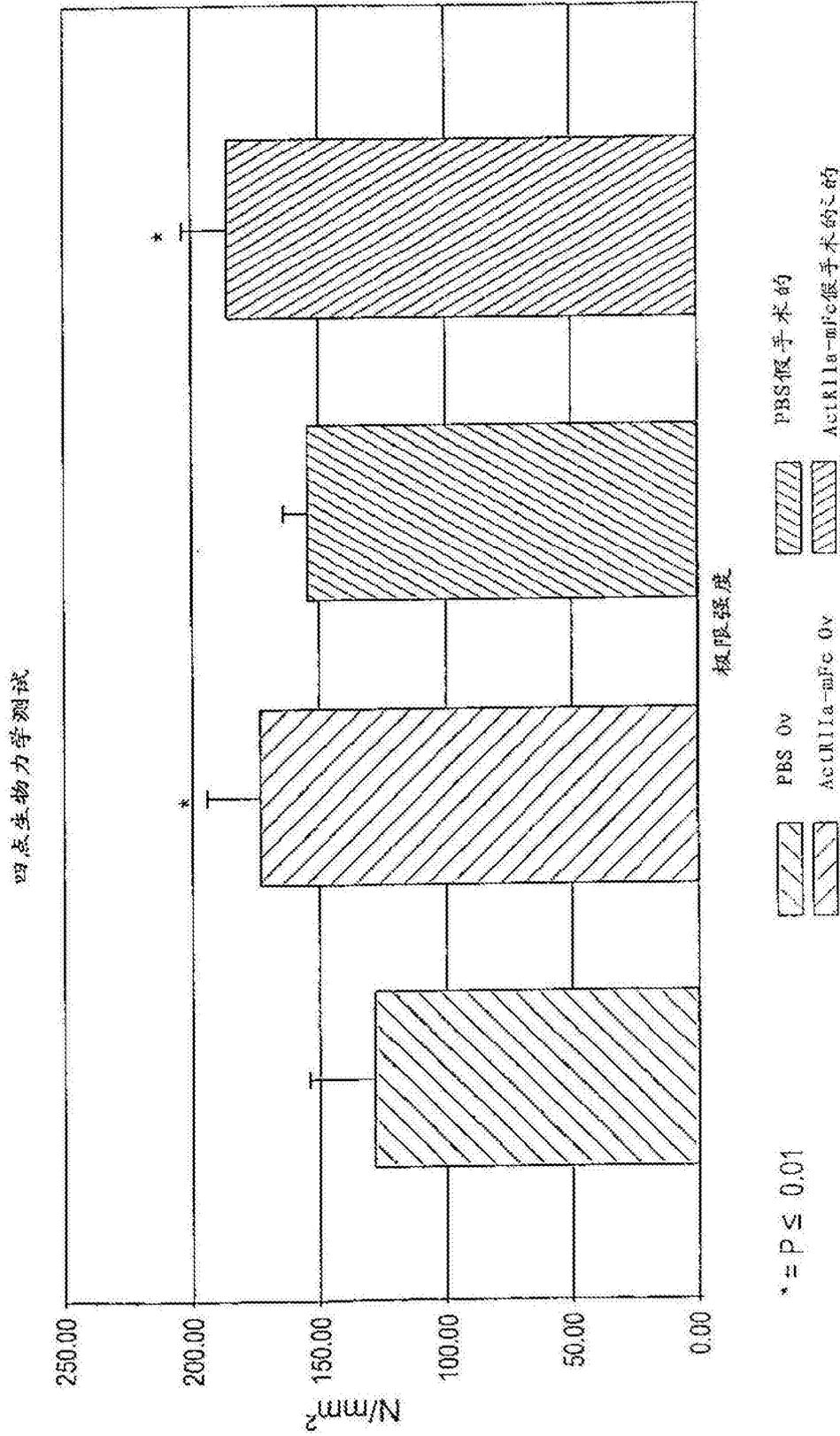
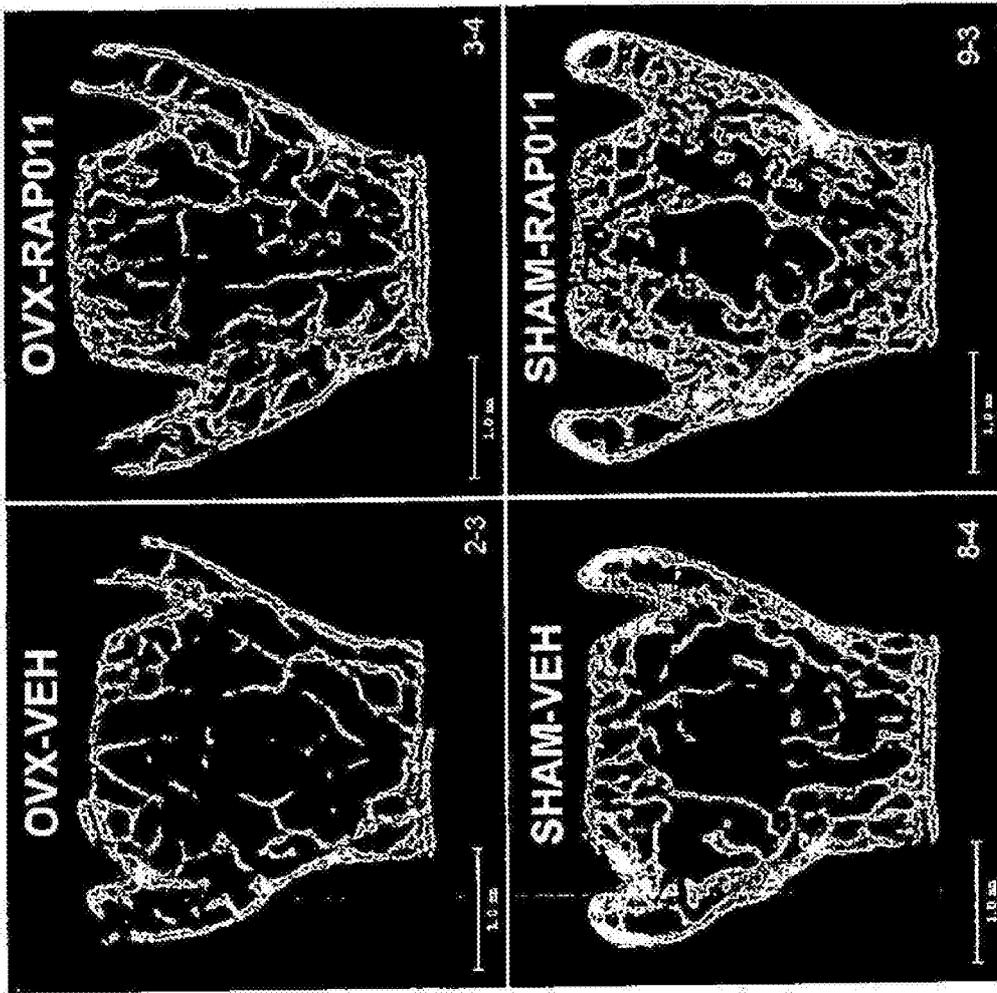


图18



研究末期的microCT数据(24周龄)

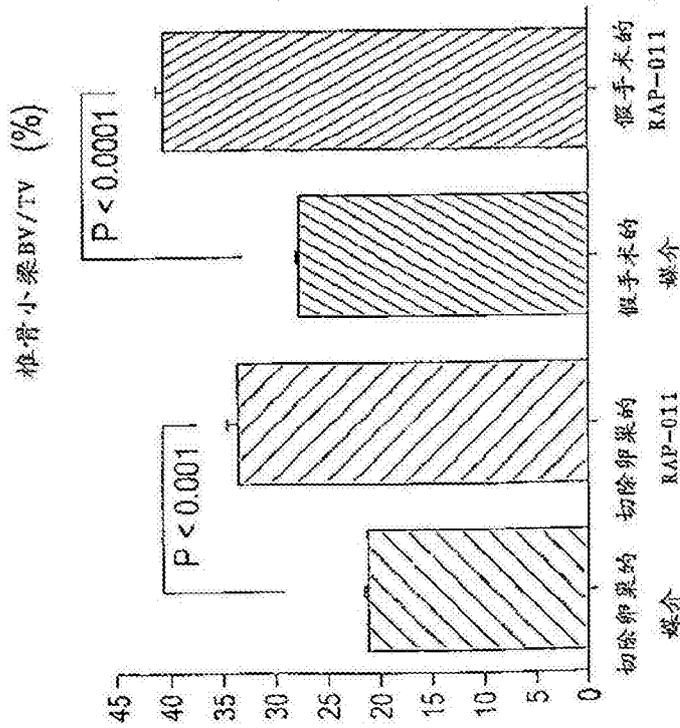
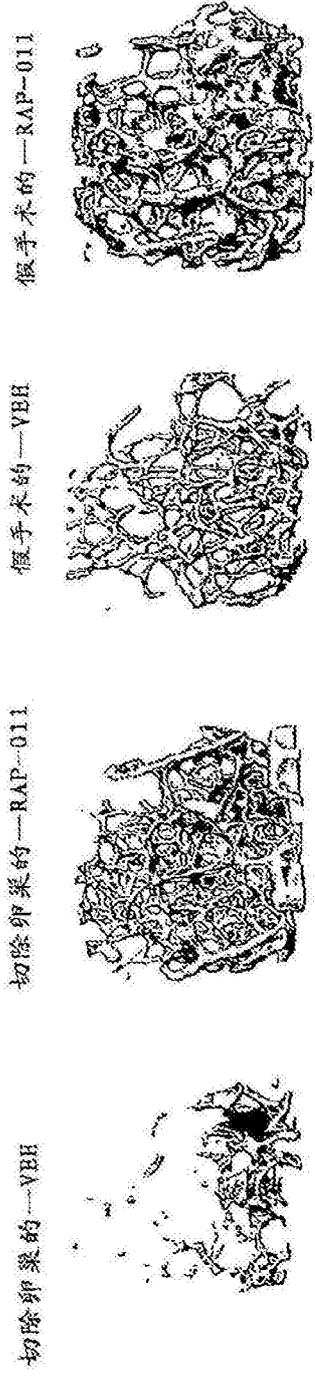


图19



在第12周	OVX-VEH	OVX-RAP-011	SHAM-VEH	SHAM-RAP-011
Tb N (mm ⁻¹)	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.2 **	3.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2 **
Tb Sp (μm)	486.2 ± 79	283.9 ± 21 **	332.4 ± 25	230.2 ± 12 **
Conn D (mm ⁻³)	8.4 ± 6	85.1 ± 13.7 **	41.4 ± 14.8	131.2 ± 16.5 **

** P < 0.01 vs VEH

图20

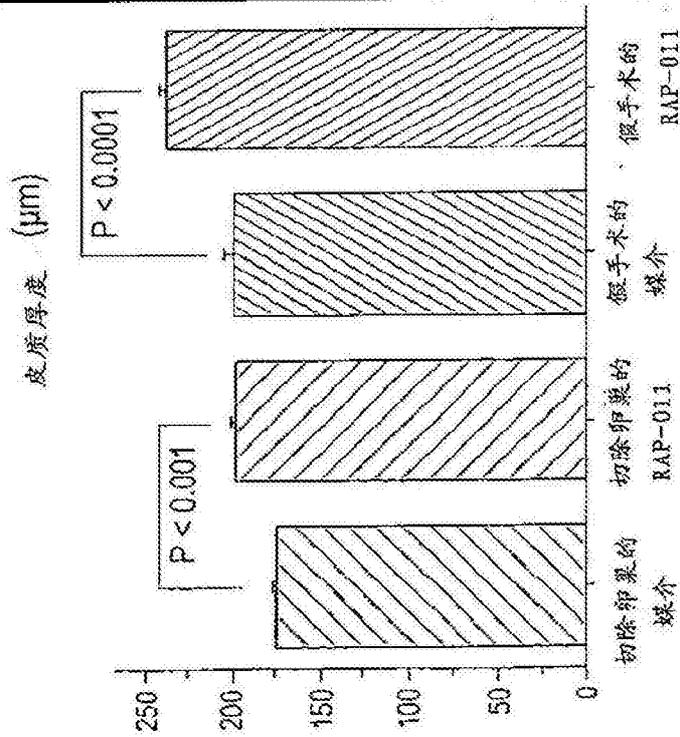
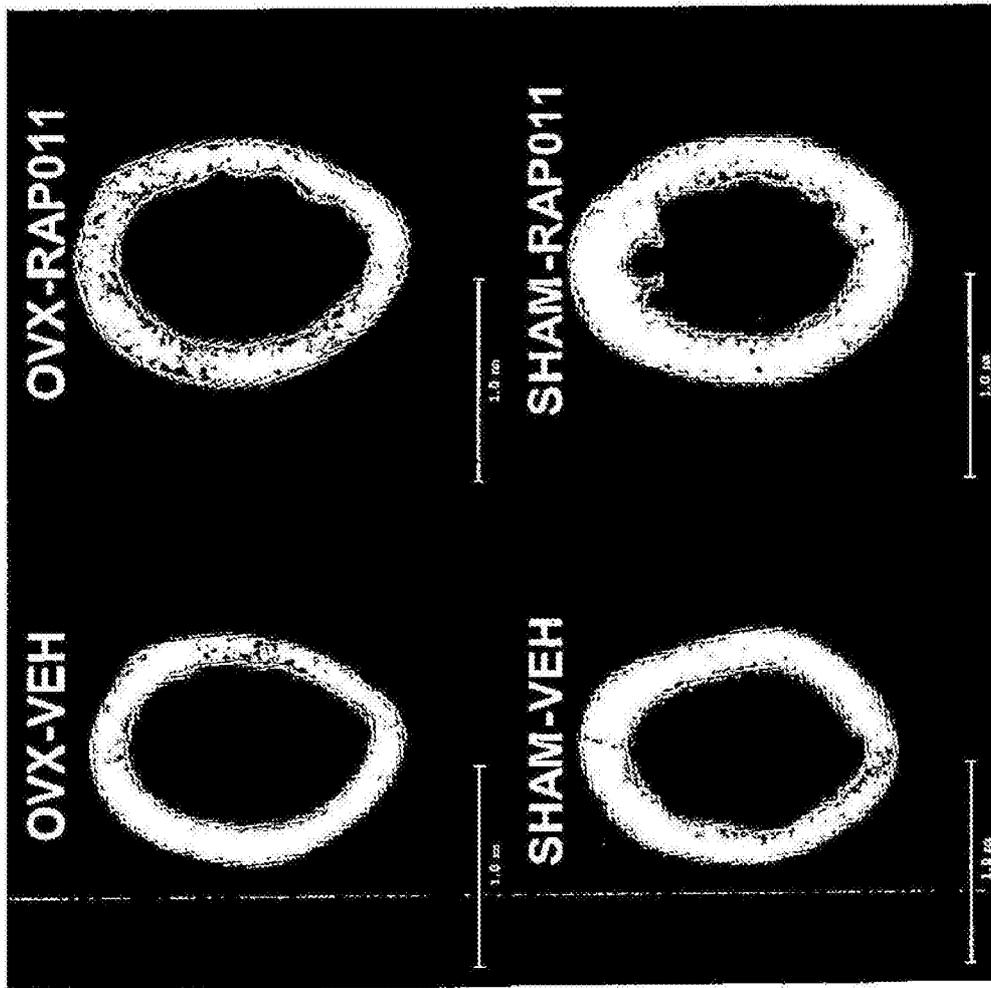


图21

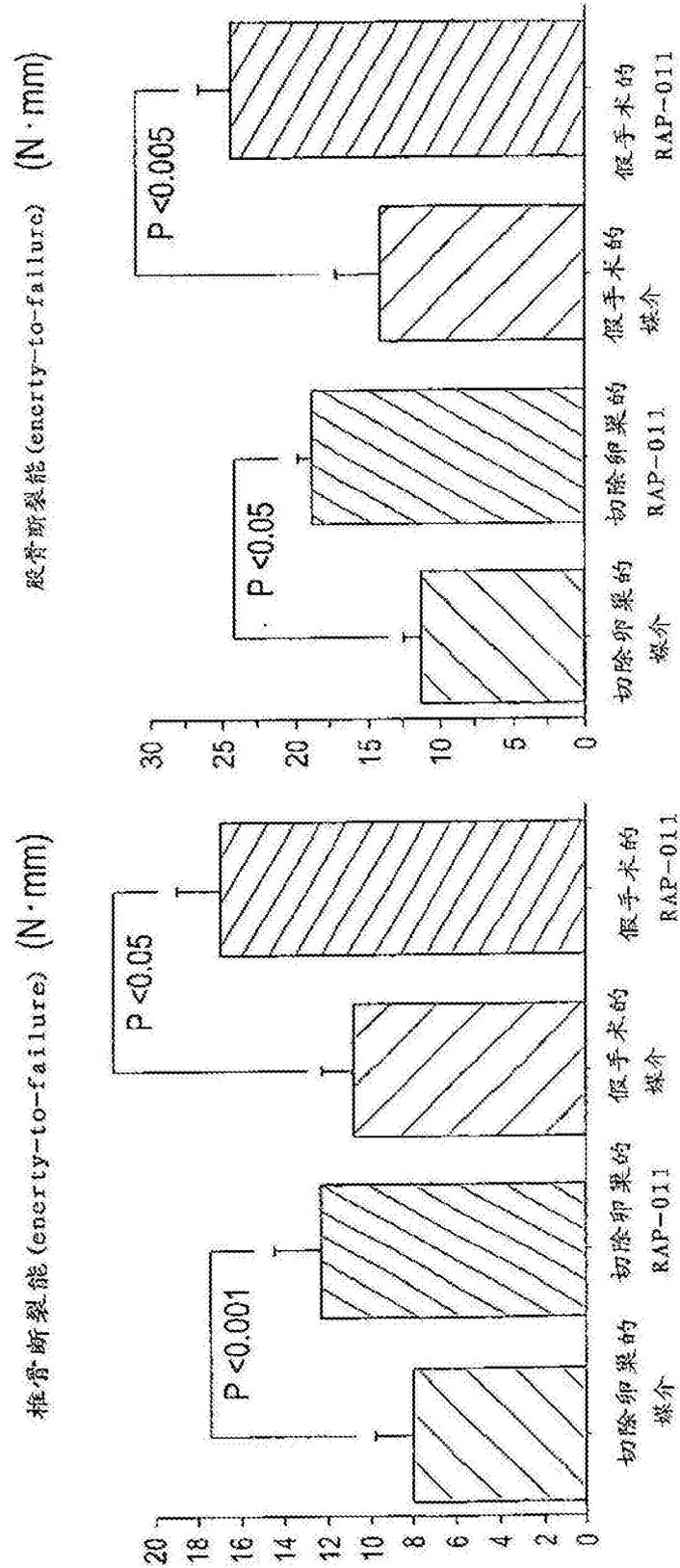


图22

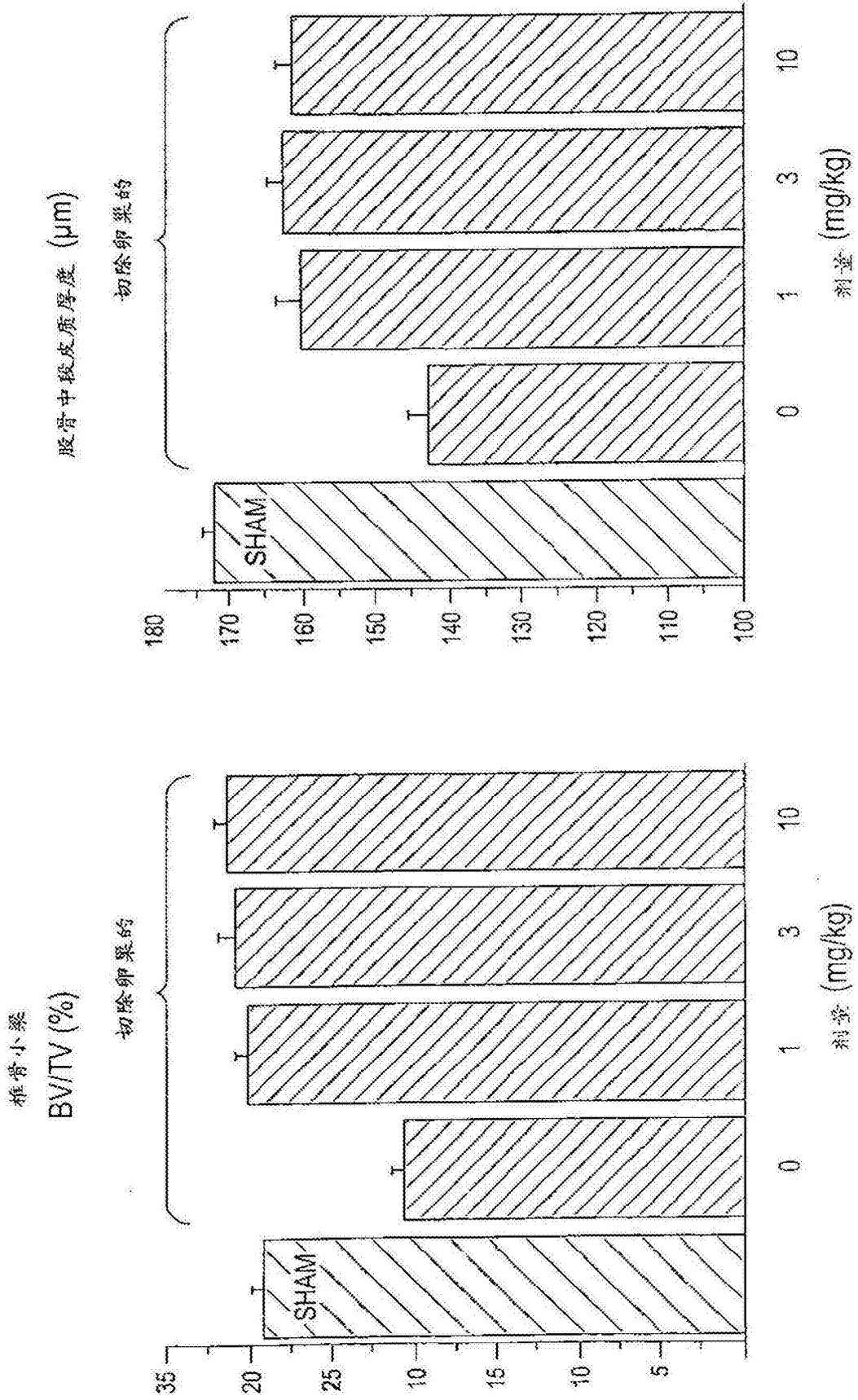


图23

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/BS (%)	MAR (um/day)	BFR/BSd (um ³ /um ² /天)
PBS均值	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011均值	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
P值	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

图24

参数	2 周 VEH (N=6)	2 周 RAP-011 (N=6)	4 周 VEH (N=6)	4 周 RAP-011 (N=6)	6 周 VEH (N=6)	6 周 RAP-011 (N=6)	12 周 VEH (N=6)	12 周 RAP-011 (N=6)
骨体积 (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.45 *	7.04 ± 0.51	15.67 ± 1.39 *	6.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53 *	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08 *
骨样表面 (OS/BS), %	4.86 ± 0.34	5.32 ± 0.49	3.95 ± 0.51	3.65 ± 0.35	3.26 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
侵蚀表面 (ES/BS), %	17.36 ± 0.89	13.93 ± 0.96 *	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.39 ± 1.31	11.89 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
成骨细胞数量/面积 (ObTari, no./mm)	428.88 ± 25.33	455.31 ± 28.23	411.84 ± 44.61	567.78 ± 53.13 *	405.22 ± 24.2	634.61 ± 35.39 *	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77 *
成骨细胞表面/骨表面 (OcS/BS), %	36.12 ± 2.42	26.43 ± 1.52 *	33.5 ± 2.53	26.14 ± 1.93	35.5 ± 1.27	35.92 ± 1.29	28.45 ± 1.32	30.24 ± 1.5
骨周缘上的成骨细胞 (Nob/SPm), %	49.33 ± 2.52	40.69 ± 1.46 *	46.52 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.26	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53
成骨细胞数量/面积 (OcTari, no./mm)	55.81 ± 4.37	69.62 ± 5.89	51.42 ± 3.58	65.08 ± 8.18	45.23 ± 3.96	62.95 ± 5.18 *	28.07 ± 1.86	61.16 ± 1.87 *
骨周缘上的成骨细胞 (Noc/SPm), %	7.55 ± 0.53	5.34 ± 0.45 *	6.25 ± 0.66	4.76 ± 0.59	5.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
成骨细胞表面/骨表面 (OcS/BS), %	8.76 ± 0.78	6.23 ± 0.5 *	6.86 ± 0.67	5.36 ± 0.62	6.33 ± 0.67	5.8 ± 0.46	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
骨小梁厚度 (TbTh), μm	13.59 ± 0.48	15.42 ± 0.45 *	13.11 ± 0.48	17.68 ± 0.76 *	12.04 ± 0.5	17.28 ± 0.35 *	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02 *
骨小梁间隙 (TbSp), μm	167.74 ± 5.88	127.57 ± 7.25 *	175.98 ± 9.3	98.61 ± 6.95 *	167 ± 7.13	104.26 ± 3.42 *	251.79 ± 18.14	98.07 ± 4.27 *
骨小梁数量 (TbN), no./mm	5.59 ± 0.19	7.09 ± 0.36 *	5.34 ± 0.23	8.73 ± 0.5 *	5.07 ± 0.18	9.27 ± 0.22 *	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29 *
矿化表面 (MS/BS), %	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73 *	4.15 ± 1.02	8.84 ± 0.77 *	3.6 ± 0.56	7.97 ± 0.73 *	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51 *
矿质结合速率 (mm/天)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.028 *	0.566 ± 0.042	0.642 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.502 ± 0.016 *	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013 *
骨形成速率 (mm ³ /mm ² /天)	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.008 *	0.025 ± 0.006	0.057 ± 0.005 *	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004 *	0.016 ± 0.002	0.036 ± 0.002 *

图 25

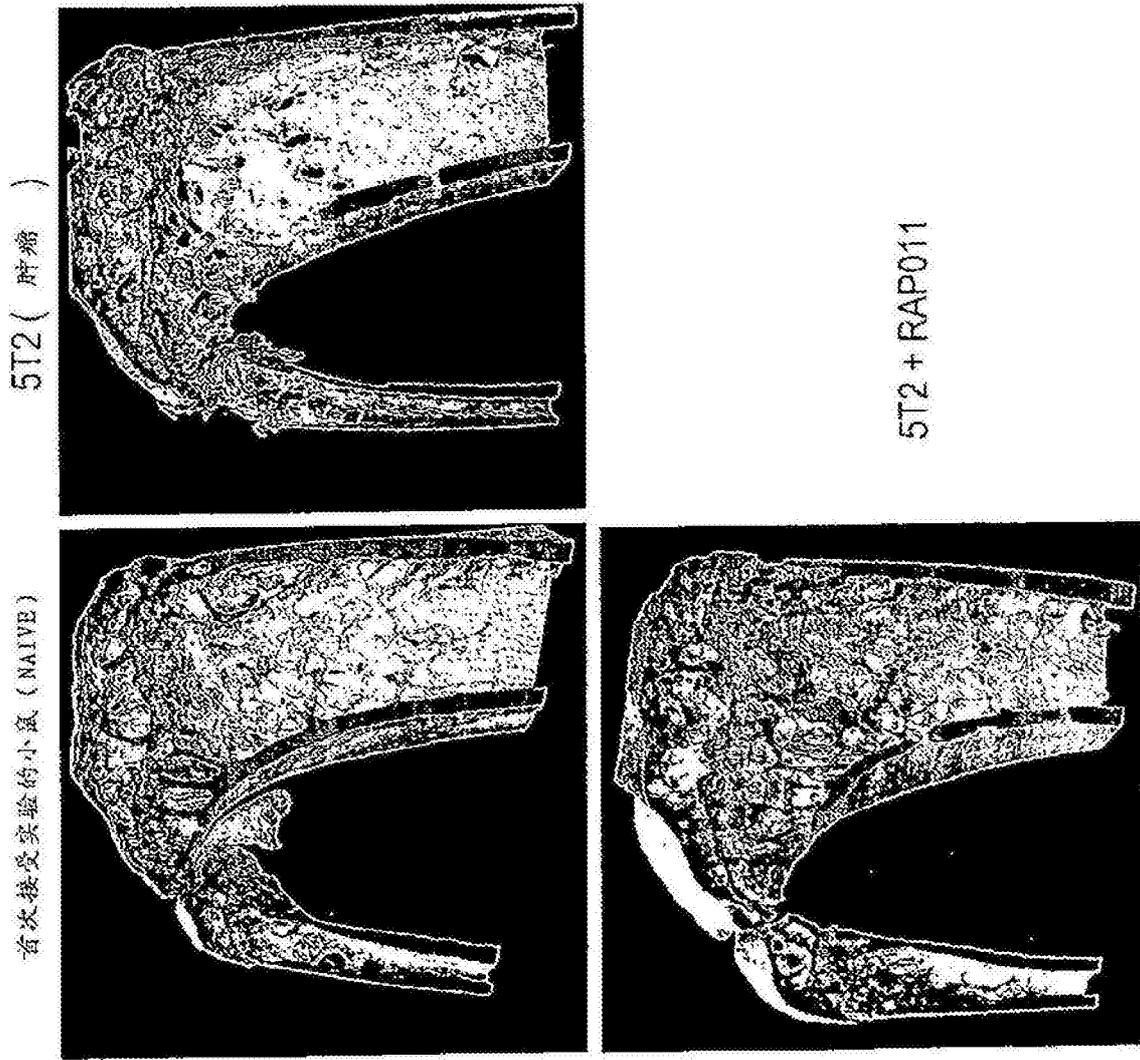


图26

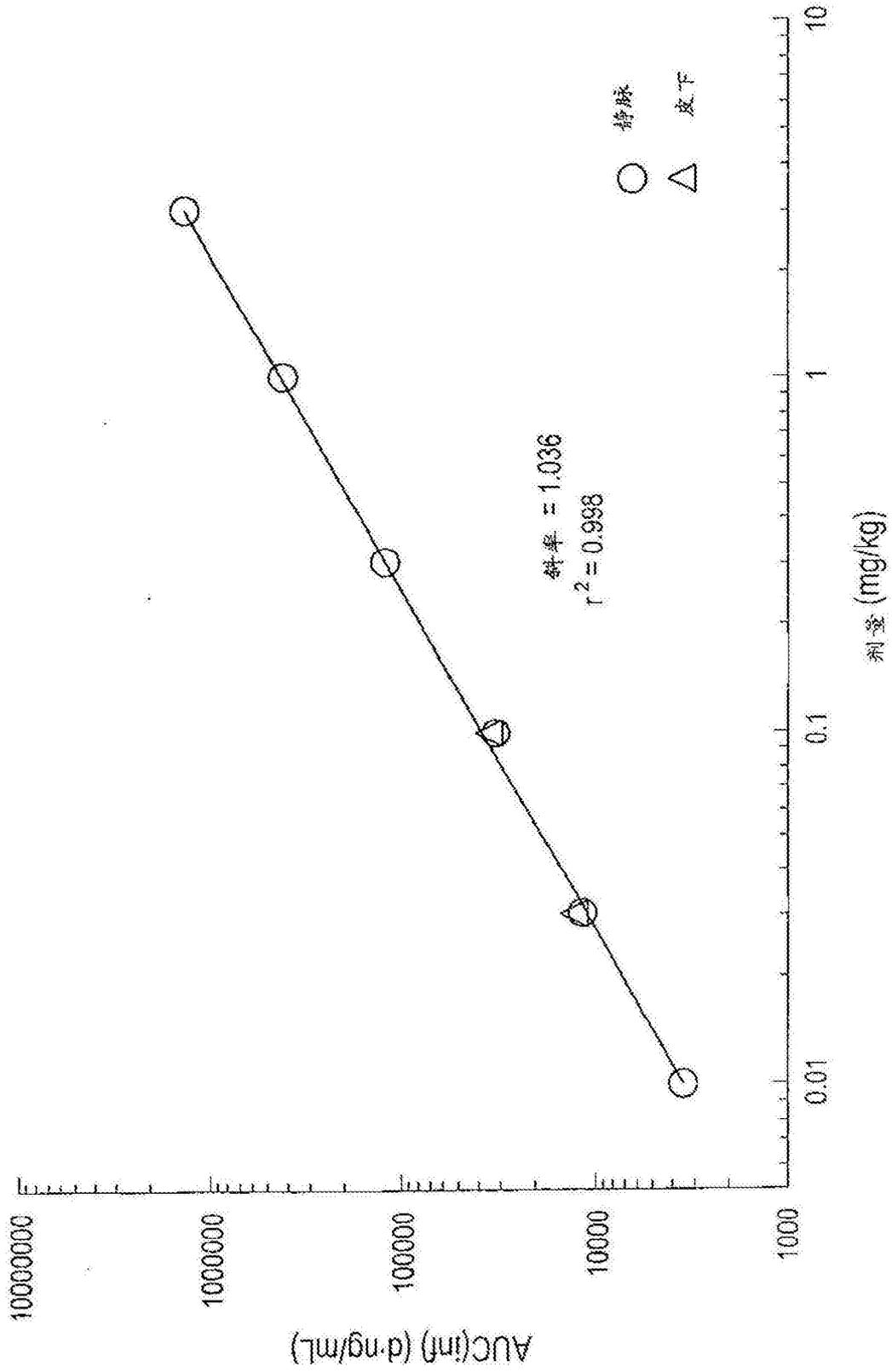


图27

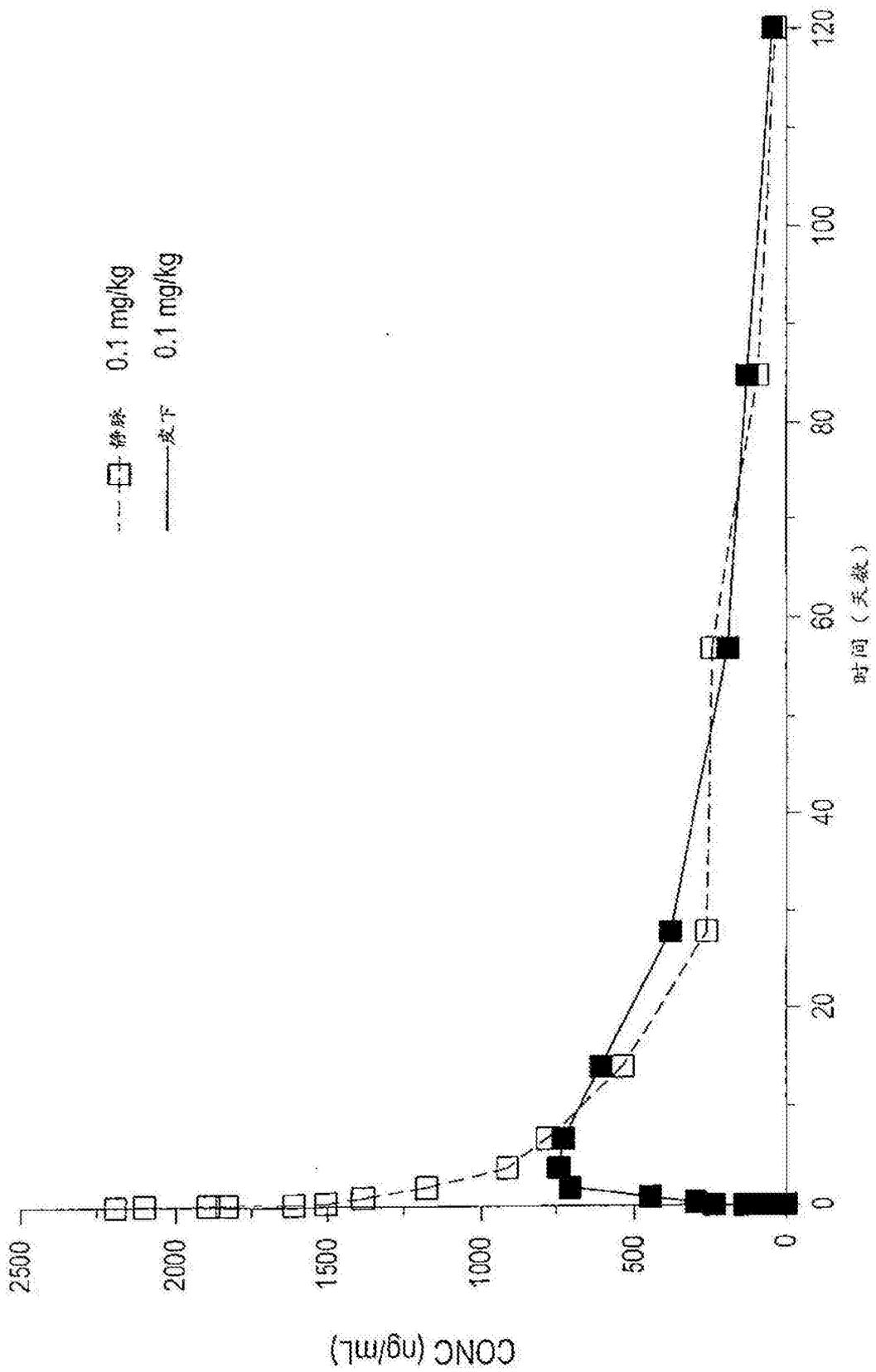


图28

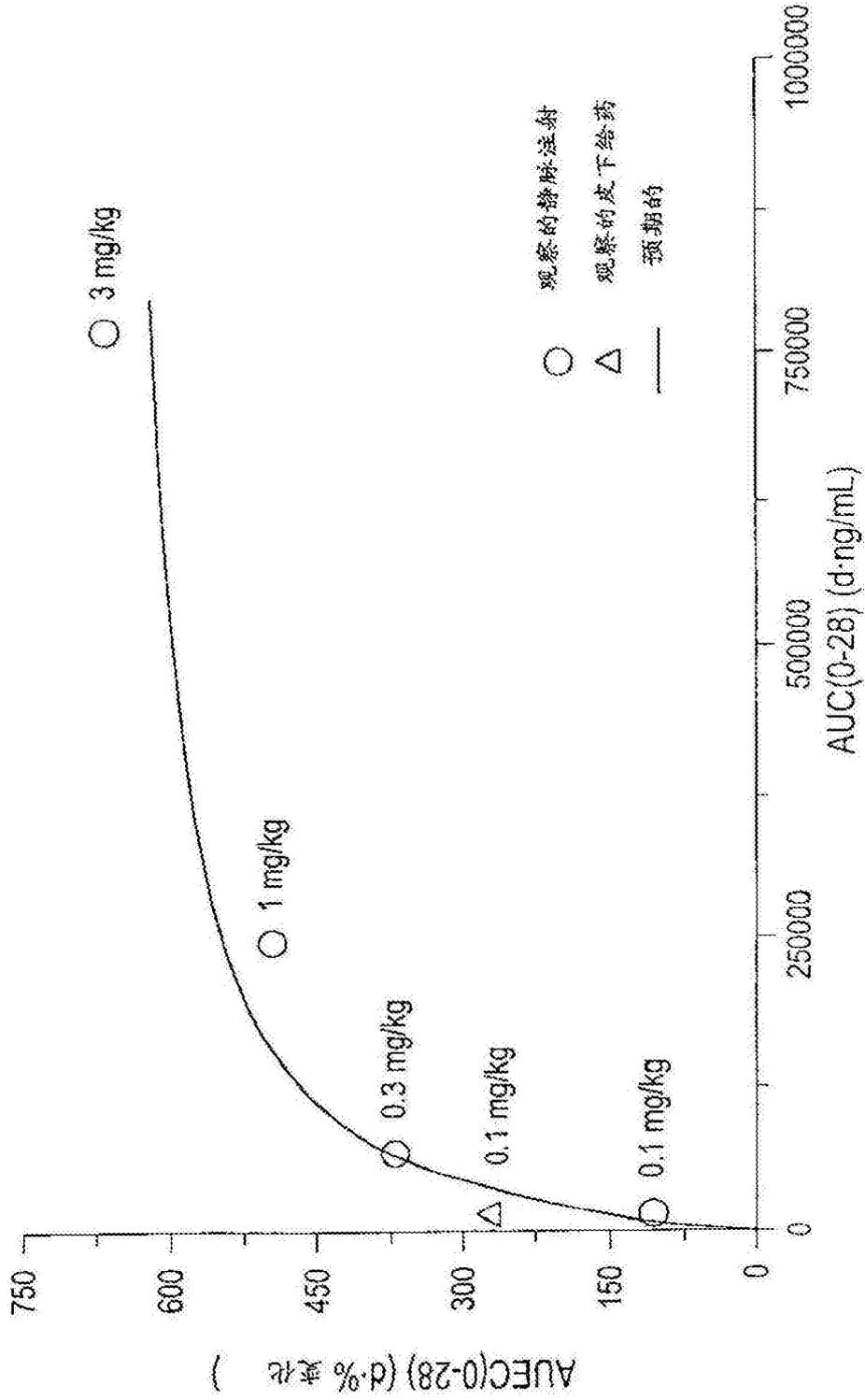


图29

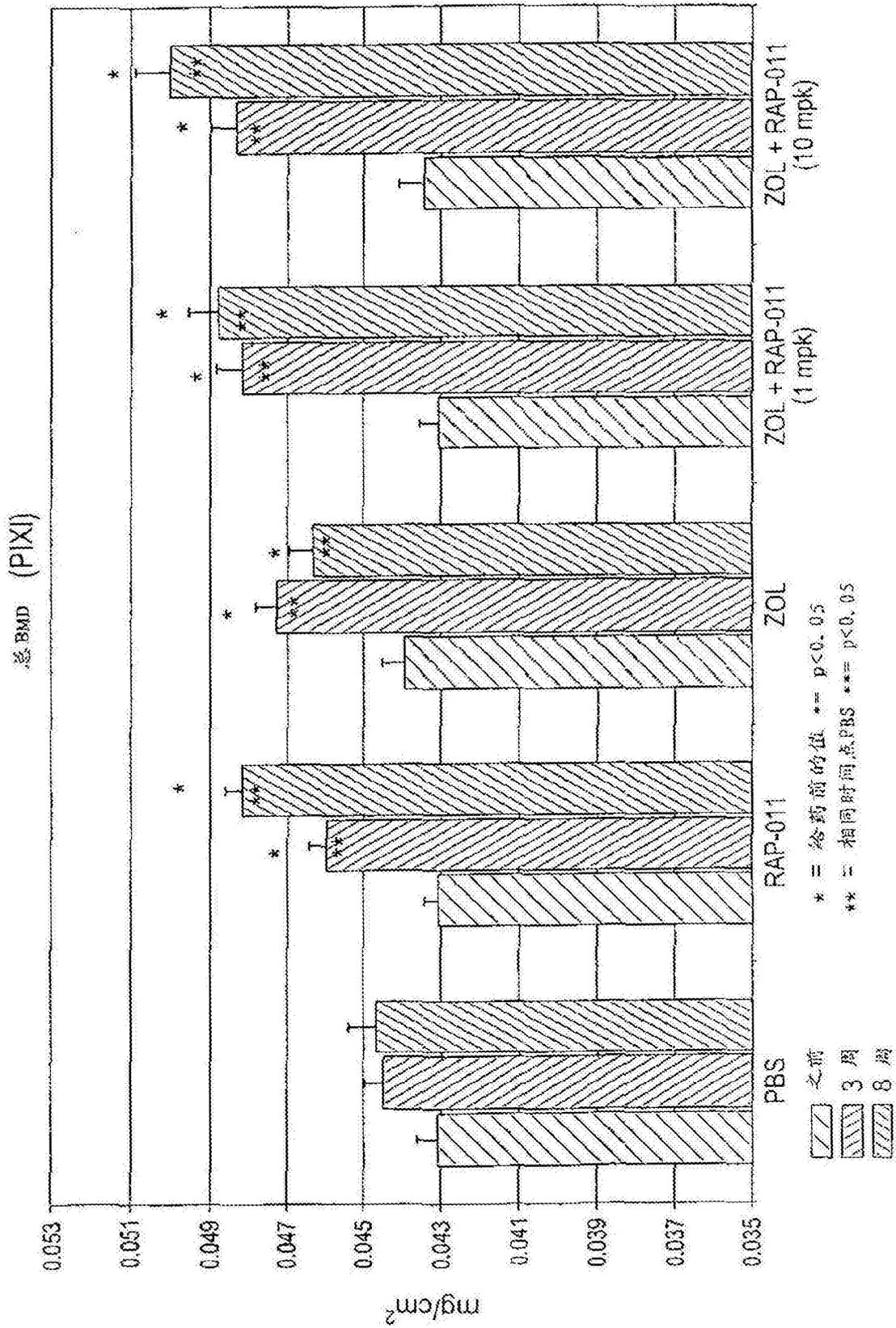


图30

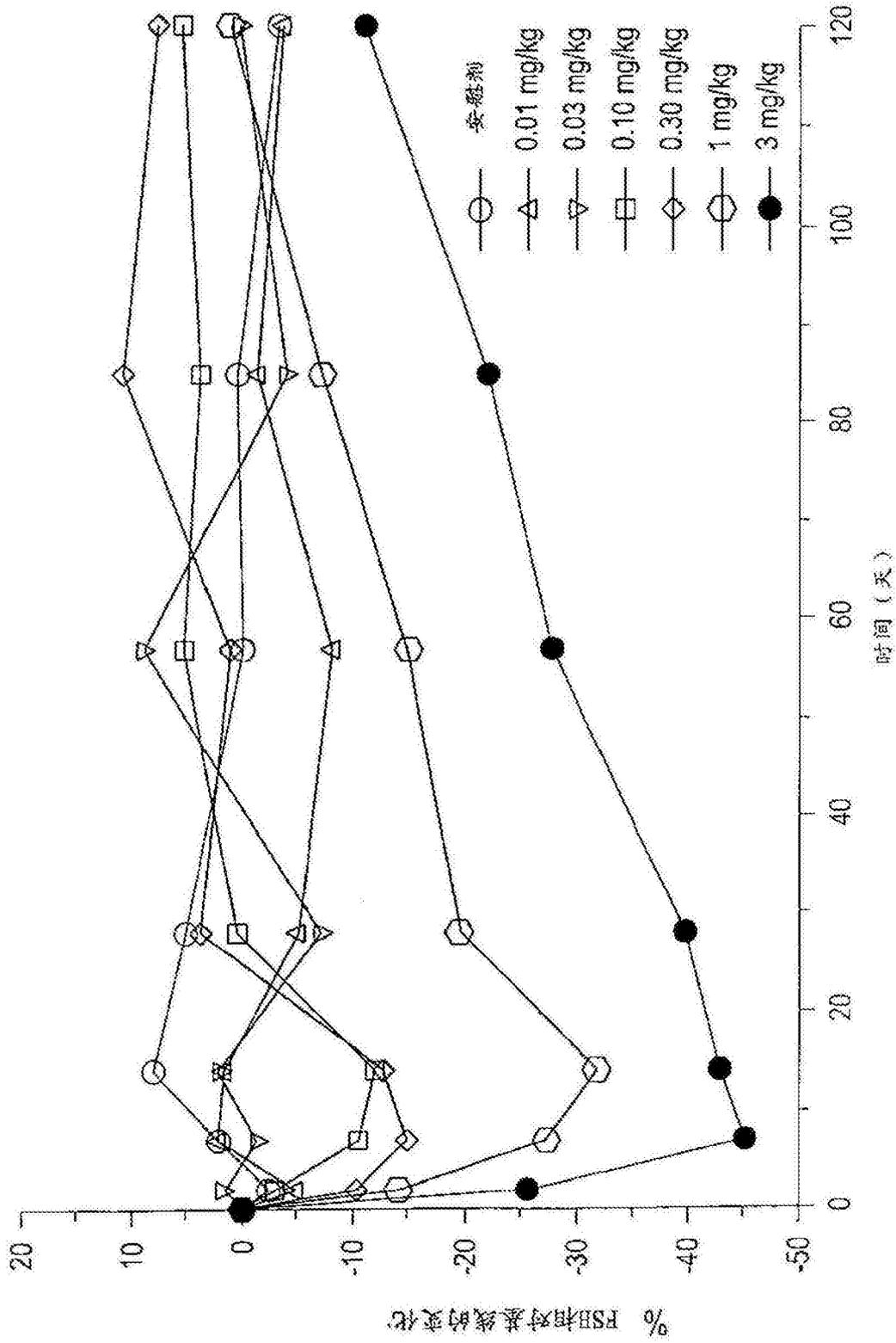


图31

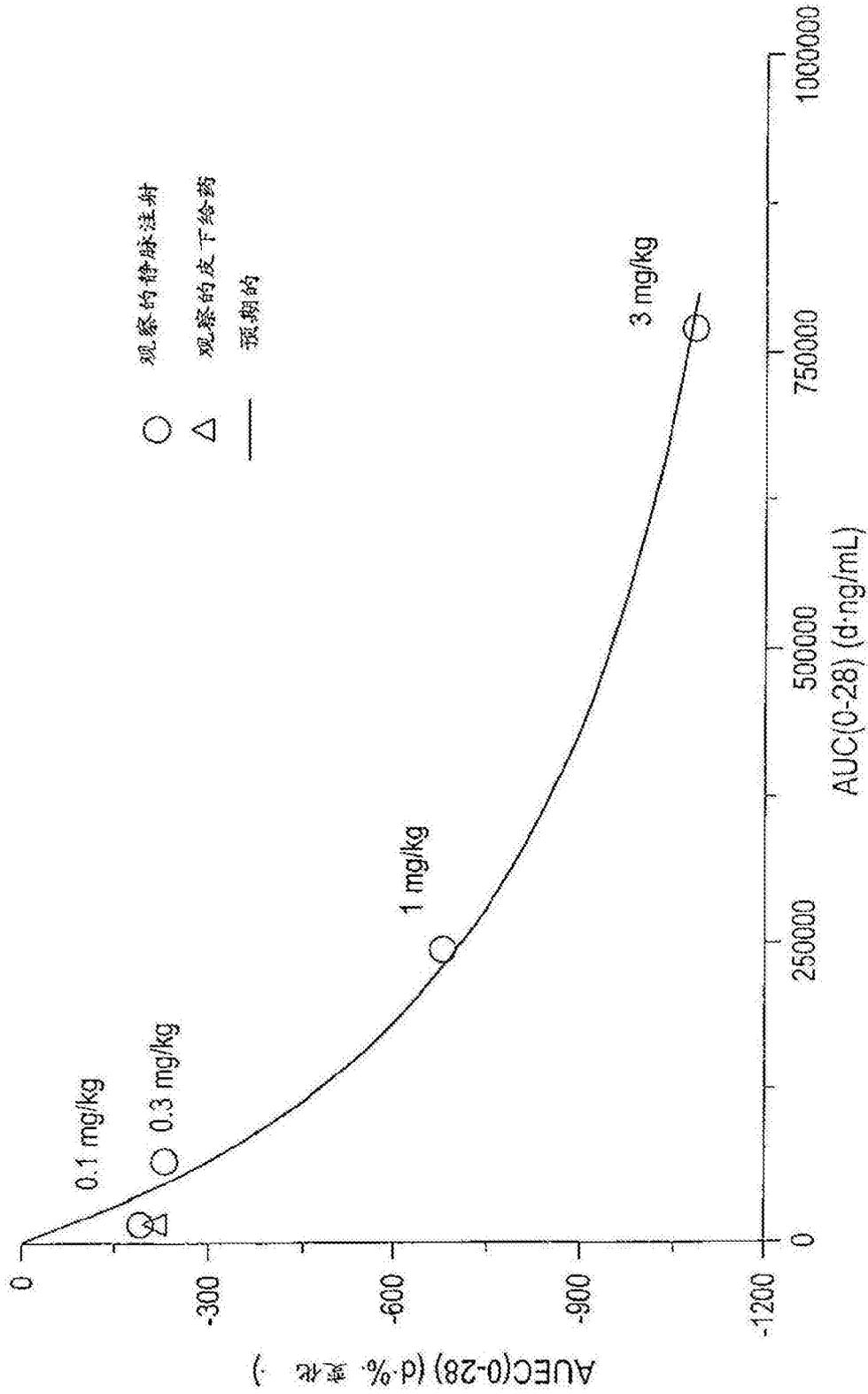


图32