



(43) 申请公布日 2015. 07. 29

1	ATGAGTATG	TGAGAGAGG	AGG	CTCTGCTG	TTCTGCTG	TTCTGCTG
	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
51	AGTGGTGG	AGTGGTGG	AGTGGTGG	AGTGGTGG	AGTGGTGG	AGTGGTGG
	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
101	N A M R L E	N A M R L E	N A M R L E	N A M R L E	N A M R L E	N A M R L E
	TGGGTTGG	TGGGTTGG	TGGGTTGG	TGGGTTGG	TGGGTTGG	TGGGTTGG
151	G G G G G G	G G G G G G	G G G G G G	G G G G G G	G G G G G G	G G G G G G
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
201	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
251	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G	N E T V E K G G G G
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
301	T A C T G C T G	T A C T G C T G	T A C T G C T G	T A C T G C T G	T A C T G C T G	T A C T G C T G
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
351	P E A G G G G G G G	P E A G G G G G G G	P E A G G G G G G G	P E A G G G G G G G	P E A G G G G G G G	P E A G G G G G G G
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
401	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
451	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
501	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
551	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
601	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
651	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG
701	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG	AGGAGTATG
	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG	CTGGGTTGG

1. 一种核酸,其包含在严格条件下与 SEQ ID NO:6 的核苷酸 73-396 的互补序列杂交的核酸序列。
2. 权利要求 1 的核酸,其中所述核酸包含 SEQ ID NO:6 的核苷酸 73-396。
3. 一种核酸,其包含在严格条件下与 SEQ ID NO:4 的核苷酸 73-396 的互补序列杂交的核酸序列。
4. 权利要求 3 的核酸,其中所述核酸包含 SEQ ID NO:4 的核苷酸 73-396。
5. 一种培养细胞,所述细胞包含权利要求 1-4 中任一项的核酸。
6. 权利要求 5 的培养细胞,其中所述细胞为哺乳动物细胞。
7. 权利要求 5 的培养细胞,其中所述细胞为 CHO 细胞。
8. 一种多肽,所述多肽选自:
 - a. 以下多肽,其包含其中氨基酸序列由 SEQ ID NO:8 的序列组成的氨基酸序列或在不超过五个氨基酸位置处不同于 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;
 - b. 通过 SEQ ID NO:4 的核酸或在严格条件下与其互补序列杂交的核酸在哺乳动物细胞中表达产生的多肽;
 - c. 通过 SEQ ID NO:6 的核酸或在严格条件下与其互补序列杂交的核酸在哺乳动物细胞中表达产生的多肽。
9. 权利要求 8 的多肽,其中所述多肽为 (a) 部分的多肽。
10. 权利要求 8 的多肽,其中所述多肽为 (b) 部分的多肽。
11. 权利要求 8 的多肽,其中所述多肽为 (c) 部分的多肽。
12. 权利要求 8-11 中任一项的多肽,其中所述多肽的氨基端具有序列 ETR。
13. 权利要求 8-12 中任一项的多肽,其中所述多肽导致小鼠的瘦体重在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著增加。
14. 权利要求 13 的多肽,其中平均增加是至少 2g 瘦组织质量。
15. 权利要求 8-14 中任一项的多肽,其中所述多肽导致高脂饮食喂饲的小鼠的脂肪质量在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。
16. 权利要求 15 的多肽,其中平均减少是至少 5g 脂肪质量。
17. 权利要求 8-16 中任一项的多肽,其中所述多肽导致高脂饮食喂饲的小鼠的血清甘油三酯水平在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。
18. 权利要求 17 的多肽,其中平均减少是至少 50mg/dl 甘油三酯。
19. 权利要求 8-18 中任一项的多肽,其中所述多肽导致高脂饮食喂饲的小鼠的血清游离脂肪酸水平在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。
20. 权利要求 19 的多肽,其中平均减少是至少 500 微摩尔 /dl 游离脂肪酸。
21. 权利要求 8-20 中任一项的多肽,其中所述多肽导致高脂饮食喂饲的小鼠的血清胰岛素水平在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。
22. 权利要求 21 的多肽,其中平均减少是至少 1ng/ml 胰岛素。
23. 权利要求 8-22 中任一项的多肽,其中所述多肽包含至少一个 N 联糖。
24. 权利要求 8-23 中任一项的多肽,其中所述多肽在 CHO 细胞中产生。
25. 权利要求 8-24 中任一项的多肽,其中所述多肽与权利要求 8-24 中任一项的第二多肽共价连接。

26. 权利要求 8-24 中任一项的多肽,其中所述多肽与第二多肽共价连接以形成同二聚体。

27. 一种包含来源于 ActRIIB 的部分和一个或多个异源部分的多肽,其中来源于 ActRIIB 的部分包含由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-131 的序列组成的氨基酸序列或在不超过五个氨基酸位置处不同于 SEQ ID NO:1 氨基酸 25-131 的序列的氨基酸序列。

28. 权利要求 27 的多肽,其中所述异源部分包含免疫球蛋白的恒定结构域。

29. 权利要求 27 的多肽,其中所述异源部分包含免疫球蛋白的 Fc 结构域。

30. 权利要求 27 的多肽,其中所述异源部分包含人 IgG1 的 Fc 结构域。

31. 权利要求 27-30 中任一项的多肽,其中来源于 ActRIIB 的部分包含由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-131 的序列组成的氨基酸序列。

32. 一种药物制剂,所述药物制剂包含权利要求 8-31 中任一项的多肽。

33. 一种用于治疗具有与肌肉丢失或肌肉生长不足相关的病症的受试者的方法,所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 32 的药物制剂。

34. 一种用于增加有需要的受试者的瘦质量或降低有需要的受试者的瘦质量丢失速度的方法,所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 32 的药物制剂。

35. 一种用于减少受试者的体脂肪含量或降低受试者的体脂肪含量增加速度的方法,所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 32 的药物制剂。

36. 一种用于治疗受试者中与非所需体重增加相关的病症的方法,所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 32 的药物制剂。

37. 一种用于治疗受试者的代谢病症的方法,所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 32 的药物制剂。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述患者具有一种或多种以下特征:

d. 高血清甘油三酯水平;

e. 高游离脂肪酸水平;或

f. 高血清胰岛素水平。

39. 权利要求 37 或 38 的方法,其中所述代谢病症选自:2 型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抵抗和肥胖症。

截短的 ACTRIIB-FC 融合蛋白

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2010年6月8日,申请号为201080035960.1(PCT/US2010/037787),发明名称为“截短的 ACTRIIB-FC 融合蛋白”。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求保护2009年6月12日提交的美国临时申请序列号61/268,420、2009年11月3日提交的61/280,543的权益。这些申请通过引用以其整体结合到本文中。

[0004] 发明背景

[0005] 转化生长因子- β (TGF- β) 超家族含有各种生长因子,它们共有共同的序列元件和结构基序。已知这些蛋白质在脊椎动物和无脊椎动物两者中对多种细胞类型发挥生物作用。该超家族的成员在图式形成和组织特化的胚胎发育期间发挥重要功能,可影响各种分化过程,包括脂肪形成、肌发生、软骨发生、心脏发生、血细胞生成、神经发生和上皮细胞分化。该家族由不同命名的蛋白表示,即激活素和抑制素、TGF- β 、生长和分化因子 (GDF) 和骨形态发生因子 (BMP)。还已知该家族的其它成员例如 Nodal 和 Lefty。通过操控 TGF- β 家族成员的活性,常常可引起生物体的重大生理改变。例如 Piedmontese 和 Belgian Blue 牛品种在 GDF8 (亦称为肌肉生长抑制素 (myostatin)) 基因中携带引起肌肉质量明显增加的功能缺失突变。Grobet 等, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4。此外,在人中, GDF8 的无活性等位基因与肌肉质量增加和据报道的异常强度有关。Schuelke 等, N Engl J Med 2004, 350:2682-8。

[0006] 肌肉、骨、脂肪、软骨和其它组织方面的变化可通过激动或拮抗由适合的 TGF- β 家族成员介导的信号转导来实现。因此,存在对起 TGF- β 超家族成员的信号转导的有效调节剂作用的物质的需要。

[0007] 发明简述

[0008] 在某些方面,本公开内容提供新型的 ActRIIB 多肽,特别是氨基端和羧基端截短物和序列改变物。在一个实施方案中,描述了包含人 ActRIIB (SEQ ID NO:1) 的氨基酸 25-131 的多肽或其变体。这样的多肽被证实在治疗多种病症特别是与肥胖症、胰岛素抵抗和其它代谢病症相关的病症中具有出人意料的功效。本文公开的 ActRIIB 多肽可用于在患者中产生各种所需作用,包括例如增加瘦体重、减少白色脂肪质量、增加褐色脂肪质量、减少血清甘油三酯、减少血清胰岛素水平或减少血清游离脂肪酸水平。本文公开的 ActRIIB 多肽可用于治疗多种病症或病况,包括肌肉和神经肌肉病症 (例如肌营养不良、肌萎缩侧索硬化 (ALS) 和肌肉萎缩)、脂肪组织病症 (例如肥胖症、脂肪性肝病)、代谢病症 (例如 2 型糖尿病、胰岛素抵抗、代谢综合征)、神经变性病症和老年相关的肌肉消耗 (muscle wasting) (肌肉衰减综合征 (sarcopenia))、前列腺癌治疗 (例如雄激素剥夺治疗) 以及与多种癌症相关的恶病质。ActRIIB 多肽的实例包括 SEQ ID NO:8 中所述的人 ActRIIB-Fc 融合蛋白,其在本文中描述为 ActRIIB(25-131)-hFc。

[0009] 在某些方面,本公开内容提供来源于 ActRIIB 的新型多肽 (被称作 ActRIIB 多肽)。在一些实施方案中,多肽可选自:以下多肽,其包含其中氨基酸序列由 SEQ ID NO:8 的序列组成的氨基酸序列或者在不超过 1、2、3、4 或 5 个氨基酸位置处不同于 SEQ ID NO:8

的氨基酸序列 ;通过 SEQ ID NO:4 的核酸或在严格条件下与其互补序列杂交的核酸在哺乳动物细胞中表达产生的多肽 ;通过 SEQ ID NO:6 的核酸或在严格条件下与其互补序列杂交的核酸在哺乳动物细胞中表达产生的多肽。本文公开的多肽可包含来源于 ActRIIB 的部分和一个或多个异源部分,其中来源于 ActRIIB 的部分可包含由 SEQ ID NO:1 氨基酸 25-131 的序列组成的氨基酸序列或在不超过 1、2、3、4 或 5 个氨基酸位置处不同于 SEQ ID NO:1 氨基酸 25-131 的序列的氨基酸序列。异源部分可包含免疫球蛋白的恒定结构域、免疫球蛋白的 Fc 结构域或者,特别地,人 IgG1 的 Fc 结构域(术语“人 IgG1”应理解为包括与在人中使用相容的这类 Fc 的变体)。ActRIIB 多肽可包含来源于 ActRIIB 的部分,其包含由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-131 的序列组成的氨基酸序列。本文公开的 ActRIIB 多肽可为氨基端具有序列 ETR 的那些。本文公开的 ActRIIB 多肽可导致小鼠的瘦体重在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著增加。瘦组织质量的平均增加可为至少 1、2、3、4 或 5 或更多克。本文公开的 ActRIIB 多肽可导致高脂饮食喂饲的小鼠的脂肪质量在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。脂肪质量的平均减少可为 5、7、10、15 或更多克。本文公开的 ActRIIB 多肽可导致高脂饮食喂饲的小鼠的血清甘油三酯水平在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。血清甘油三酯的平均减少可为至少 50、75、100、125 或 150 或更多 mg/dl。本文公开的 ActRIIB 多肽可导致高脂饮食喂饲的小鼠的血清游离脂肪酸水平在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。游离脂肪酸的平均减少可为至少 500、750、1000 或更多的微摩尔 /dl 游离脂肪酸。本文公开的 ActRIIB 多肽可导致高脂饮食喂饲的小鼠的血清胰岛素水平在以 10mg/kg 的剂量水平每周两次治疗四周后统计上显著减少。血清胰岛素的平均减少可为至少 0.5、1、1.5、2 或更多 ng/ml 胰岛素。本文所用术语“统计上显著的”一般是指 p 值或者 >0.05,但显著性的其它衡量可被认可用于统计检验的各种类型,并且在这样的情况下,术语“统计上显著的”应使用用于评价数据显著性的最广泛使用的公式。ActRIIB 多肽可包含至少一个 N 联糖,并且可包含两个、三个或更多个 N 联糖。此类多肽还可包含 O 联糖。ActRIIB 多肽可在以适于患者应用的方式糖基化蛋白的多种细胞系中产生,所述细胞系包括工程改造的昆虫细胞或酵母细胞以及哺乳动物细胞例如 COS 细胞、CHO 细胞、HEK 细胞和 NS0 细胞。ActRIIB 多肽可形成共价或非共价的二聚体,包括同二聚体。一般而言,Fc 融合蛋白易于形成共价连接的同二聚体。任一种前述多肽可掺入药物制剂中。

[0010] 在某些方面,本文公开的 ActRIIB 多肽结合 ActRIIB 配体,例如 GDF8、GDF11、激活素、BMP7、GDF3 或 nodal。ActRIIB 多肽任选以少于 10 微摩尔或少于 1 微摩尔、100 纳摩尔、10 纳摩尔、1 纳摩尔或 0.1 纳摩尔的 Kd 结合 ActRIIB 配体。与天然存在的 ActRIIB 多肽相比,本文公开的 ActRIIB 多肽在氨基酸序列中(例如在配体结合域中)可包括 1、2、3、4、5 个或更多个改变。氨基酸序列的改变可例如改变所述多肽的糖基化(当在哺乳动物、昆虫或其它真核细胞中产生时),或者与天然存在的 ActRIIB 多肽相比,改变所述多肽的蛋白酶剪切。ActRIIB 多肽可为融合蛋白,其具有来源于 ActRIIB 的氨基酸序列(例如 ActRIIB 的配体结合域或其变体)作为一个结构域和一个或多个提供所需性质(例如药代动力学改进、更容易纯化、靶向特定组织等)的额外的结构域。例如,融合蛋白的结构域可提高以下性质中的一种或多种:体内稳定性、体内半衰期、摄取/给予、组织定位或分布、蛋白质复合体的形成、融合蛋白的多聚化和/或纯化。ActRIIB 融合蛋白可包含免疫球蛋白 Fc 结构域(野

生型或突变型)或血清白蛋白。在某些实施方案中,ActRIIB-Fc 融合物包含位于 Fc 结构域和胞外 ActRIIB 结构域之间相对松散的接头。该松散接头可相当于 ActRIIB 胞外域的 C 端的大约 15 个氨基酸的松散区(“尾巴”),或者其可为介于 5 和 15、20、30、50 个或更多个氨基酸之间相对缺乏二级结构的人工序列。接头可富含甘氨酸和脯氨酸残基,并可含有例如苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列(例如 TG4 或 SG4 重复序列)。在 SEQ ID NO:8 的多肽的情形中,采用短的柔性接头似乎是有利的,例如 1、2、3、4 或 5 个甘氨酸残基,任选带有一个或多个小残基例如丙氨酸、苏氨酸或丝氨酸。融合蛋白可包含纯化亚序列,例如表位标签、FLAG 标签、聚组氨酸序列和 GST 融合物。任选 ActRIIB 多肽包含一个或多个选自以下的修饰氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。

[0011] 在某些方面,ActRIIB 多肽可作为药物制剂配制。优选药物制剂是无致热原的(意指无致热原至由控制用于治疗应用的产品质量的规章所要求的程度)。药物制剂还可包含一种或多种其它的化合物,例如用于治疗 ActRII 相关病症的化合物。

[0012] 在某些方面,本公开内容提供编码 ActRIIB 多肽的核酸。这样的核酸可包含 SEQ ID NO:4 的 73-396 核酸序列或在严格条件下与 SEQ ID NO:4 的核苷酸 73-396 的互补序列杂交的核酸序列。核酸可为包含 SEQ ID NO:4 序列的核酸。这样的核酸可包含 SEQ ID NO:6 的 73-396 核酸序列或在严格条件下与 SEQ ID NO:6 的核苷酸 73-396 的互补序列杂交的核酸序列。核酸可为包含 SEQ ID NO:6 序列的核酸。在某些方面,可在哺乳动物细胞系中表达 ActRIIB 蛋白,所述哺乳动物细胞系适当介导 ActRIIB 蛋白的天然糖基化以减少患者不利免疫应答的可能性(包括兽医患者的可能性)。已成功利用人和 CHO 细胞系,预期其它常见的哺乳动物表达载体将是有益的。因此,本公开内容提供包含任一种本文公开的核酸的培养细胞。此类细胞可为哺乳动物细胞,包括 CHO 细胞、NSO 细胞、HEK 细胞和 COS 细胞。其它细胞可依据预期患者的物种来选择。其它细胞公开于本文中。培养细胞应理解为意指在实验室或其它人工条件(例如冷冻或培养基中)中保持并且不为活的生物体的一部分的细胞。

[0013] 在某些方面,本公开内容提供用于制备 ActRIIB 多肽的方法。这类方法可包括在合适的细胞(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达本文公开的任何核酸(例如 SEQ ID NO:4 或 6 及严格条件下与其杂交的核酸)。这类方法可包括:a)在适于表达 ActRIIB 多肽的条件下培养细胞,其中所述细胞用 ActRIIB 表达构建体转化;和 b)回收如此表达的 ActRIIB 多肽。ActRIIB 多肽可利用用于从细胞培养物中获得蛋白质的任何熟知技术和本文所述技术作为未加工部分、部分纯化部分或高度纯化部分回收。

[0014] 在某些方面,本公开内容提供用于治疗具有与肌肉丢失或肌肉生长不足相关的病症的受试者的方法。此类方法可包括向受试者给予有效量的任一种前述 ActRIIB 多肽或其药物制剂。

[0015] 在某些方面,本公开内容提供用于增加有需要的受试者的瘦质量或降低有需要的受试者的瘦质量丢失速度的方法。此类方法可包括向受试者给予有效量的任一种前述 ActRIIB 多肽或其药物制剂。

[0016] 在某些方面,本公开内容提供用于减少受试者的体脂肪含量或降低受试者的体脂肪含量增加速度的方法。此类方法可包括向受试者给予有效量的任一种前述 ActRIIB 多肽

或其药物制剂。

[0017] 在某些方面,本公开内容提供用于治疗受试者的与非所需体重增加相关的病症的方法。此类方法可包括向受试者给予有效量的任一种前述 ActRIIB 多肽或其药物制剂。

[0018] 在某些方面,本公开内容提供用于治疗受试者的代谢病症的方法。此类方法可包括给予受试者有效量的任一种前述 ActRIIB 多肽或其药物制剂。适于治疗的患者可具有一个或多个以下特征:高血清甘油三酯水平;高游离脂肪酸水平;或高血清胰岛素水平。代谢病症的实例包括 2 型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抵抗和肥胖症。

[0019] 在某些方面,本文公开的 ActRIIB 多肽可用于治疗具有与肌肉丢失或肌肉生长不足相关的病症的受试者的方法。此类病症包括肌肉萎缩、肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)以及肌肉消耗病症(例如恶病质、厌食、DMD 综合征、BMD 综合征、AIDS 消耗综合征、肌营养不良、神经肌肉疾病、运动神经元疾病、神经肌肉接头的疾病和炎性肌病)。方法可包括给予有需要的受试者有效量的 ActRIIB 多肽。

[0020] 在某些方面,本文公开的 ActRIIB 多肽可用于以下方法,该方法用于减少体脂肪含量或降低体脂肪含量的增加速度,以及用于治疗与非所需体重增加相关的病症,例如肥胖症、非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)、心血管疾病、癌症、高血压、骨关节炎、中风、呼吸问题和胆囊疾病。这些方法可包括给予有需要的受试者有效量的 ActRIIB 多肽。

[0021] 在某些特定方面,本文公开的 ActRIIB 多肽可用于用于治疗 GDF8 的异常活性相关的病症的方法。此类病症包括代谢病症,例如 2 型糖尿病、葡萄糖耐量降低、代谢综合征(例如 X 综合征)、以及创伤(例如烧伤或氮不平衡)诱发的胰岛素抵抗;脂肪组织病症(例如肥胖症);肌营养不良(包括杜兴肌营养不良);肌萎缩侧索硬化(ALS);肌肉萎缩;器官萎缩;虚弱;腕管综合征;充血性阻塞性肺病;肌肉衰减综合征、恶病质和其它肌肉消耗综合征;骨质疏松症;糖皮质激素诱发的骨质疏松症;骨质减少;骨关节炎;骨质疏松症相关的骨折;由长期的糖皮质激素治疗引起的低骨量、性腺早衰、雄激素抑制、维生素 D 缺乏症、继发性甲状旁腺功能亢进、营养缺乏和神经性厌食症。所述方法可包括给予有需要的受试者有效量的 ActRIIB 多肽。

[0022] 在某些方面,本公开内容提供用于鉴定刺激组织(例如骨、软骨、肌肉和脂肪)生长的物质的方法。所述方法包括:a)鉴定与 ActRIIB 多肽竞争结合 ActRIIB 多肽的配体结合域的试验物质;和 b)评价所述物质对组织生长的作用。

[0023] 在某些方面,本公开内容提供用于拮抗细胞中 ActRIIB 多肽或 ActRIIB 配体(例如 GDF8、GDF11、激活素、GDF3、BMP7 和 Nodal)的活性的方法。所述方法包括将细胞与 ActRIIB 多肽接触。任选 ActRIIB 多肽或 ActRIIB 配体的活性通过 ActRIIB/ActRIIB 配体复合体介导的信号转导来监测,例如通过监测细胞增殖。所述方法的细胞包括成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞和肌肉细胞。

[0024] 在某些方面,本公开内容提供 ActRIIB 多肽在制备用于治疗如本文所述的病症或病况的药物中的用途。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 显示了 ActRIIB(25-131)-hFc 的全长未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。TPA 前导序列(残基 1-22)和双重截短的 ActRIIB 胞外域(残基 24-131,使用基于 SEQ ID NO:1 的天然序列的编号)各自用下划线表示。突出显示的是通过测序揭示为成熟融合蛋白

的 N 端氨基酸的谷氨酸,其位于相对于 SEQ ID NO:1 的 25 位。

[0027] 图 2 显示了编码 ActRIIB(25-131)-hFc 的核苷酸序列(编码链显示在顶部,SEQ ID NO:4,互补链显示在底部 3'-5',SEQ ID NO:5)。编码 TPA 前导序列的序列(核苷酸 1-66)和编码 ActRIIB 胞外域的序列(核苷酸 73-396)用下划线表示。还显示了 ActRIIB(25-131)的相应氨基酸序列。

[0028] 图 3 显示了编码 ActRIIB(25-131)-hFc 的备选核苷酸序列(编码链显示在顶部,SEQ ID NO:6,互补链显示在底部 3'-5',SEQ ID NO:7)。该序列赋予最初转化体中较大水平的蛋白表达,使细胞系发预成为更快的过程。编码 TPA 前导序列的序列(核苷酸 1-66)和编码 ActRIIB 胞外域的序列(核苷酸 73-396)用下划线表示,并且突出显示 ECD 的野生型核苷酸序列中的取代(见图 2)。还显示了 ActRIIB(25-131)的相应氨基酸序列。

[0029] 图 4 显示了用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗四周对小鼠中瘦组织质量的作用。溶媒是 Tris 缓冲盐水(TBS)。数据为平均值($n = 10$ 只/组) \pm SEM。**,通过非配对 t 检验对比 TBS 的 $P < 0.01$ 。ActRIIB(25-131)-hFc 治疗以明显的剂量依赖方式增加瘦组织质量。

[0030] 图 5 显示了用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗四周对小鼠中胸肌肌肉质量的作用。溶媒为 Tris 缓冲盐水(TBS)。数据为平均值($n = 10$ 只/组) \pm SEM。*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$,通过非配对 t 检验对比 TBS 得到。ActRIIB(25-131)-hFc 治疗以明显的剂量依赖方式增加胸肌肌肉质量。

[0031] 图 6 显示了 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗对小鼠握力的作用。溶媒为 Tris 缓冲盐水(TBS)。数据为平均值($n = 10$ 只/组)。**,通过非配对 t 检验对比 TBS 的 $P < 0.01$ 。ActRIIB(25-131)-hFc 治疗以剂量依赖方式增加握力。

[0032] 图 7 显示了用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗四周对雄激素剥夺的小鼠模型中瘦组织质量的作用。溶媒为 Tris 缓冲盐水(TBS)。睾丸切除(ORX)或假手术小鼠的数据为平均值($n = 10$ 只/组) \pm SD。***,对比 TBS 对照的 $P < 0.001$ 。ActRIIB(25-131)-hFc 与其全长相对物 ActRIIB(20-134)-mFc 同样有效地增加瘦组织质量。

[0033] 图 8 显示了 ActRIIB(25-131)-hFc 在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对瘦组织质量的作用。溶媒为 Tris 缓冲盐水(TBS)。数据为平均值($n = 9-10$ 只/组)。***,对比 TBS 对照的 $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中 ActRIIB(25-131)-hFc 有效增加瘦组织质量。

[0034] 图 9 显示了 ActRIIB(25-131)-hFc 在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对脂肪质量的作用。溶媒为 Tris 缓冲盐水(TBS)。数据为平均值($n = 9-10$ 只/组) \pm SD。*, $P < 0.05$;***, $P < 0.001$ (对比 TBS 对照)。与溶媒相比,ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 12 周在高脂饮食喂饲的小鼠中减少约一半脂肪质量。

[0035] 图 10 描述了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠血清甘油三酯浓度。数据为平均值 \pm SEM。***, $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中,ActRIIB(25-131)-hFc 减少甘油三酯的浓度超过 50%,从而使甘油三酯正常化至标准饮食对照中观察到的水平。

[0036] 图 11 描述了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠血清游离脂肪酸(FFA)浓度。数据为平均值 \pm SEM。***, $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中,ActRIIB(25-131)-hFc 减少 FFA 浓度接近 55%,从而使 FFA 正常化至标准饮食对照中观察

到的水平。

[0037] 图 12 描述了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠血清高密度脂蛋白 (HDL) 浓度。数据为平均值 \pm SEM. ***, $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-hFc 减少 HDL 浓度接近 50%, 从而使 HDL 正常化至标准饮食对照中观察到的水平。

[0038] 图 13 描述了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠血清低密度脂蛋白 (LDL) 浓度。数据为平均值 \pm SEM. *, $P < 0.05$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-hFc 减少 LDL 浓度超过 40%。

[0039] 图 14 描述了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠血清胰岛素浓度。数据为平均值 \pm SEM. **, $P < 0.01$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-hFc 减少胰岛素浓度超过 60%, 从而使胰岛素正常化至标准饮食对照中观察到的水平。

[0040] 图 15 描述了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠血清脂连蛋白浓度。ELISA 测定检测了所有主要的寡聚同种型 (总脂连蛋白), 数据为平均值 \pm SEM. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-hFc 增加脂连蛋白浓度超过 75%, 甚至显著地提高脂连蛋白至高于在标准饮食对照中观察到的水平。

[0041] 图 16 显示了在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中通过用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天在附睾白色脂肪组织内诱发的产热组织学变化。所有的显微图像以相同的放大率显示。苏木精和曙红 (H&E) 染色提示 ActRIIB(25-131)-hFc 减少脂滴大小并诱导多房脂肪细胞簇 (箭头) (褐色脂肪的特征) 的能力。不相邻切片的免疫染色揭示在多房脂肪细胞和单房脂肪细胞中均有 UCP1 的广泛胞质诱导 (绿色荧光)。

[0042] 图 17 显示了 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天在饮食诱发的肥胖症小鼠模型中对附睾白色脂肪中的 UCP1 mRNA 水平的影响。通过逆转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR) 得到的呈相对单位 (RU) 的数据, 为平均值 \pm SEM; $n = 6-7$ 只 / 组; *, $P < 0.05$ 。ActRIIB(25-131)-hFc 导致编码褐色脂肪的这种选择性标记的 mRNA 60 倍增加, 因此提示该白色脂肪库内产热能力的上调。

[0043] 图 18 显示了作为饮食和 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天的函数的小鼠附睾白色脂肪中脂连蛋白 mRNA 水平。呈相对单位 (RU) 的 RT-PCR 数据, 为平均值 \pm SEM; $n = 7$ 只 / 组; *, $P < 0.05$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-hFc 增加脂连蛋白 mRNA 水平超过 60%, 从而有利于这些小鼠中循环脂连蛋白的浓度的提高。

[0044] 图 19 显示了 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 60 天在饮食诱发的肥胖症小鼠模型中对脂肪性肝沉积 (肝脂肪变性) 的作用。用 Oil Red O 染色的肝切片 (所有以相同的放大率显示) 揭示了在高脂饮食条件而非对照条件下显著的脂质沉积。箭头指示许多密集脂滴中的一些, 其被染成亮红色但在黑白图像中难以辨别。ActRIIB(25-131)-hFc 抑制此类脂滴的形成并很大程度上将肝组织的外观恢复至标准饮食喂饲的小鼠的肝组织外观。

[0045] 图 20 显示了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 35 天在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对腹部脂肪的分布的作用。内脏和皮下脂肪库通过涵盖了脊髓节段 T13-L5 的显微计算机断层扫描术 (显微 CT) 在体内检测和区分。 $N = 4$ 只 / 组; 比例尺 = 5mm。相对于高脂饮食喂饲的对照, ActRIIB(25-131)-mFc 治疗减少腹部脂肪的内脏和皮下脂肪库两者的体积。

[0046] 图 21 显示了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 60 天在饮食诱发的肥胖症的小鼠模

型中对通过显微 CT 测定的内脏脂肪体积的作用。数据为平均值 \pm SEM; $n = 4$ 只 / 组; ***, $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-mFc 相对于溶媒减少内脏脂肪体积超过 60%。

[0047] 图 22 显示了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 60 天在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对通过显微 CT 测定的腹部皮下脂肪的体积的作用。数据为平均值 \pm SEM; $n = 4$ 只 / 组; ***, $P < 0.001$ 。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-mFc 相对于溶媒减少皮下脂肪的体积近 60%。

[0048] 图 23 显示了在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中作为饮食和 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 60 天的函数的肩胛间褐色脂肪库双侧对的图。高脂饮食增加库的大小并减淡库的颜色, 而 ActRIIB(25-131)-mFc 极大地逆转了这些变化。

[0049] 图 24 显示了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 60 天在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对肩胛间褐色脂肪的质量的作用。组合的左边库和右边库的数据为平均值 \pm SEM; ***, $p < 0.001$ 。ActRIIB(25-131)-mFc 逆转了高脂饮食对该褐色脂肪库的质量的作用。

[0050] 图 25 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 60 天在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对通过显微 CT 测定的肩胛间褐色脂肪密度的作用。数据 (平均值 \pm SEM) 以基于骨矿物质羟磷灰石 (HA) 的正值和水的零值的标准化单位表示; 因此, 脂肪值为负值, 而白色脂肪的值通常接近 -120。**, $p < 0.01$ 。ActRIIB(25-131)-mFc 完全逆转了高脂饮食对该褐色脂肪库的密度的作用。

[0051] 图 26 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗对衰老小鼠模型中通过核磁共振 (NMR) 分析在多个时间点测定的瘦组织质量的作用。数据为 10-15 只小鼠 / 组 / 时间点的平均值; ***, 相对于同一时间点的溶媒的 $p < 0.001$ 。在给药 7 周后, 用 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗的衰老小鼠的瘦组织质量从基线增加了近 20%, 相比之下溶媒治疗的对照的值基本不变。

[0052] 图 27 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗在衰老小鼠模型中对多个时间点确定的前肢握力的作用。数据为 13-15 只小鼠 / 组 / 时间点的平均值; **, 相对于同一时间点的溶媒的 $p < 0.01$ 。用 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗的小鼠显示在研究期间握力增加的整体趋势, 相比之下溶媒对照在相同间隔内观察到握力下降。

[0053] 图 28 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 8 周对衰老小鼠模型中通过双能 X 线吸收测定法 (DEXA) 测定的骨矿物质密度的作用。数据为平均值 \pm SEM; *, $P < 0.05$ 。用 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗的衰老小鼠 ($n = 10$) 中的骨矿物质密度相对于溶媒治疗的对照 ($n = 14$) 显著增加。

[0054] 图 29 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗对衰老小鼠模型中通过 NMR 分析在多个时间点测定的全身脂肪质量的作用。数据为 10-15 只小鼠 / 组 / 时间点的平均值。***, 相对于同一时间点的溶媒的 $P < 0.001$ 。给药 7 周后, 用 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗的衰老小鼠中的脂肪质量表现出自基线减少的百分比超过溶媒治疗的对照的减少幅度的两倍。

[0055] 图 30 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 8 周在衰老小鼠模型中对血清胰岛素浓度的作用。数据为平均值 \pm SEM; *, $P < 0.05$ 。用 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗的衰老小鼠 ($n = 10$) 中的胰岛素浓度相对于溶媒治疗的对照 ($n = 14$) 减少超过 40%。

[0056] 图 31 描述了 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 8 周对循环糖化血红蛋白 (A1C) 浓度的作用。数据为平均值 \pm SEM; $n = 5-6$ 只 / 组; **, $P < 0.01$ 。ActRIIB(25-131)-mFc 显著减少

糖化血红蛋白（在长时间内的平均血糖浓度的广泛认可的指示物）的浓度。

[0057] 图 32 描述了 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 5 周在癌症恶病质的小鼠模型中对通过 NMR 分析测定的瘦组织质量的作用。数据为平均值 \pm SEM;***, $P < 0.001$ 。在植入肿瘤的小鼠中, 溶媒治疗 ($n = 7$) 与瘦组织质量的 7% 丢失相关, 而 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 ($n = 12$) 导致瘦组织质量从基线增加 27%。

[0058] 详述

[0059] 1. 综述

[0060] 在某些方面, 本公开内容涉及 ActRIIB 多肽。本文所用术语“ActRIIB”是指来源于任何物种的 IIB 型激活素受体 (ActRIIB) 蛋白和 ActRIIB 相关蛋白的家族。ActRIIB 家族的成员通常均是跨膜蛋白, 由具有富含半胱氨酸的区的配体结合胞外域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸 / 苏氨酸激酶特异性的胞质结构域组成。

[0061] 术语“ActRIIB 多肽”用于指包含 ActRIIB 家族成员的任何天然存在的多肽及其保持有用活性的任何变体 (包括突变型、片段、融合物和肽模拟物形式) 的多肽。例如 ActRIIB 多肽包括来源于任何已知 ActRIIB 序列、具有以下序列的多肽, 所述序列与 ActRIIB 多肽序列有至少约 80% 同一性、优选至少 85%、90%、95%、97%、99% 或更大同一性。

[0062] 人 ActRIIB 前体具有以下氨基酸序列, 其中信号肽用下划线表示, 胞外域用黑体字表示, 潜在的 N 联糖基化位点加框表示 (SEQ ID NO:1) (NM_001106, 512aa)。

[0063] MTAPWVALALLWGSLWPG **SGRGEAETRECIYYNANWELERTN****QSGLERCEGEQDKRLHC**

YASWRN**SSGTIELVKKGCVLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE**

AGGPEVTYEPPTAPT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQL
LEIKARGRFVCVWKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHD
KGS LTDYLGKNIITWNE LCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFLAVRF
EPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPS
LEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
TNVDLPPESSI

[0064] ActRIIB 多肽可包含 ActRIIB 蛋白的任何天然存在的胞外域及其保持有用活性的任何变体 (包括突变型、片段和肽模拟物形式)。例如, ActRIIB 蛋白的胞外域与配体结合且一般是可溶的。信号序列可为 ActRIIB 的天然信号序列, 或者来自另一蛋白的信号序列例如组织纤溶酶原激活物 (TPA) 信号序列或蜜蜂蜂毒肽 (honey bee melatin, HBM) 信号序列。

[0065] 在某种程度上, 本公开内容提供新型 ActRIIB 多肽, 其经截短使得来源于 ActRIIB 的部分来自 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-131。如本文所示, 该类型的多肽当作为 Fc 构建体 ActRIIB(25-131)-hFc 给予时, 促进瘦体重 (主要是肌肉) 的形成和脂肪质量的丢失, 同时还对代谢参数例如血清甘油三酯、血清游离脂肪酸和血清胰岛素水平具有显著的所需作用。值得注意的是, ActRIIB(25-131)-hFc 对这些代谢参数的作用比相关蛋白 ActRIIB(20-134) 的作用大得多。这些数据在以下的实例中示出。

[0066] TGF- β 信号由 I 型和 II 型丝氨酸 / 苏氨酸激酶受体的异聚复合体介导, 所述受体在配体刺激时磷酸化并激活下游 Smad 蛋白 (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell

Biol. 1:169-178)。这些 I 型和 II 型受体均为跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸的区的配体结合胞外域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸 / 苏氨酸特异性的胞质结构域组成。I 型受体是信号转导所必需的;II 型受体是结合配体和表达 I 型受体所必需的。I 型和 II 型激活素受体在配体结合后形成稳定的复合体,导致 I 型受体被 II 型受体磷酸化。

[0067] 两种相关的 II 型受体 ActRIIA 和 ActRIIB 已被鉴定为激活素的 II 型受体 (Mathews 和 Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano 等, 1992, Cell 68:97-108)。除激活素之外, ActRIIA 和 ActRIIB 可在生物化学上与若干其它的 TGF- β 家族蛋白 (包括 BMP7、Nodal、GDF8 和 GDF11) 相互作用 (Yamashita 等, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee 和 McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo 和 Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957; Oh 等, 2002, Genes Dev. 16:2749-54)。

[0068] 在某些实施方案中,本发明涉及用主题 ActRIIB 多肽 (例如 ActRIIB-Fc 多肽) 拮抗 ActRIIB 受体的配体 (也被称作 ActRIIB 配体)。因此,本发明的组合物和方法可用于治疗与 ActRIIB 受体的一种或多种配体的异常活性相关的病症。ActRIIB 受体的示例性配体包括一些 TGF- β 家族成员,例如激活素、Nodal、GDF3、GDF8、GDF11 和 BMP7。

[0069] 激活素是二聚多肽生长因子并属于 TGF- β 超家族。有三种激活素 (A、B 和 AB), 其为两个紧密相关的 β 亚基的同二聚体 / 异二聚体 ($\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)。在 TGF- β 超家族中,激活素是独一无二且多功能的因子,其可在卵巢和胎盘细胞中刺激激素产生、支持神经元细胞存活、视细胞类型积极或消极地影响细胞周期进程并至少在两栖类胚胎中诱导中胚层分化 (DePaolo 等, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson 等, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963)。此外,从刺激的人单核细胞白血病细胞中分离的红细胞分化因子 (EDF) 被认为与激活素 A 相同 (Murata 等, 1988, PNAS, 85:2434)。据提示激活素 A 在骨髓中充当红细胞生成的天然调节剂。在若干组织中,激活素信号转导被其相关的异二聚体抑制素所拮抗。例如,在垂体的促卵泡激素 (FSH) 的释放期间,激活素促进 FSH 的分泌和合成,而抑制素防止 FSH 的分泌和合成。可调节激活素的生物活性和 / 或与激活素结合的其它蛋白包括下述的促滤泡素抑制素 (FS)、促滤泡素抑制素相关蛋白 (FSRP)、 $\alpha 2$ 巨球蛋白、Cerberus 和内皮联蛋白。

[0070] 骨形态发生蛋白 7 (BMP7), 也被称作成骨蛋白 -1 (OP-1), 众所周知其诱导软骨和骨形成。此外, BMP7 调节一系列生理过程。值得注意的是, BMP7 近期已被鉴定为褐色脂肪细胞分化的关键促进剂 (Tseng 等, 2008, Nature 454:1000-1004)。在该研究中, BMP7 的基因缺损导致鼠胚胎中褐色脂肪的缺乏和 UCP1 的接近完全缺少。此外, 在小鼠中通过腺病毒给予使 BMP7 表达上调增加褐色脂肪质量和能量消耗。与激活素相似, BMP7 与 II 型受体 ActRIIA 和 ActRIIB 结合。然而, BMP7 和激活素招募截然不同的 I 型受体至异二聚体受体复合体。观察到的主要 BMP7 I 型受体为 ALK2, 而激活素仅结合 ALK4 (ActRIIB)。BMP7 和激活素引发截然不同的生物应答和活化不同的 Smad 途径 (Macias-Silva 等, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36)。

[0071] 生长和分化因子 3 (GDF3), 也被称作 Vg1- 相关 2, 在胚胎发育中具有重要作用并且在成年期期间还涉及脂肪形成。简而言之, GDF3 在白色脂肪组织中的表达与体重或肥胖症相关 (Weisberg 等, 2003, J Clin Invest 112:1796-1808), 并且腺病毒介导的 GDF3 的过表达加重高脂饮食条件下野生型小鼠中观察到的肥胖的增加 (Wang 等, 2004, Biochem

Biophys Res Commun 321:1024-1031)。重要的是,GDF3 基因缺损的小鼠当保持标准饮食时是健康且基本正常的,但当保持高脂饮食时免受肥胖症并表现出增加的基础代谢率 (Shen 等, 2009, Mol Endocrinol 23:113-123)。综上,这些发现提示 GDF3 特异地涉及饮食诱发的肥胖症和更一般地涉及肥胖的调节。

[0072] Nodal 蛋白在中胚层和内胚层诱导和形成以及轴结构例如心脏和胃在早期胚胎发生中的随后组中发挥作用。已被证明在发育的脊椎动物胚胎中椎组织主要有利于脊索和脊索前板的轴结构,虽然其招募周围的细胞形成非轴的胚胎结构。Nodal 似乎通过 I 型和 II 型受体两者和已知为 Smad 蛋白的细胞内效应物来信号转导。近来的研究支持了以下概念: ActRIIA 和 ActRIIB 充当 Nodal 的 II 型受体 (Sakuma 等, Genes Cells. 2002, 7:401-12)。据提示 Nodal 配体与它们的辅因子 (例如 *cripto*) 相互作用以激活激活素 I 型和 II 型受体,其磷酸化 Smad2。Nodal 蛋白涉及对早期脊椎动物胚胎关键的许多事件,包括中胚层形成、前图式形成 (anterior patterning) 和左右轴特化。实验证据证实,Nodal 信号转导激活 pAR3-Lux,其为之前显示对激活素和 TGF- β 特异响应的萤光素酶报告分子。然而,Nodal 无法诱导 pTlx2-Lux,其特异地对骨形态发生蛋白响应的报告分子。近来的研究结果提供了直接的生化证据:Nodal 信号转导由激活素-TGF- β 途径 Smad——Smad2 和 Smad3 两者介导。进一步的证据显示,胞外 *cripto* 蛋白为 Nodal 信号转导所必需,使其有别于激活素或 TGF- β 信号转导。

[0073] 生长和分化因子 8 (GDF8) 也被称为肌肉生长抑制素。GDF8 是骨骼肌肉质量的负调节剂。GDF8 高表达于发育中的骨骼肌和成年骨骼肌中。转基因小鼠中 GDF8 的无效突变特征在于骨骼肌的显著肥大和增生 (McPherron 等, Nature, 1997, 387:83-90)。骨骼肌质量的类似增加在牛 (Ashmore 等, 1974, Growth, 38:501-507; Swatland 和 Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron 和 Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; 和 Kambadur 等, Genome Res., 1997, 7:910-915) 和引人注目的人 (Schuelke 等, N Engl J Med 2004; 350:2682-8) 的 GDF8 的天然存在突变中明显。研究还显示在人中与 HIV 感染相关的肌肉消耗伴随着 GDF8 蛋白表达的增加 (Gonzalez-Cadavid 等, PNAS, 1998, 95:14938-43)。另外, GDF8 可调节肌肉特异酶 (例如肌酸激酶) 的产生并调节成肌细胞的增殖 (WO 00/43781)。GDF8 前肽可非共价地结合成熟的 GDF8 结构域二聚体,使其生物活性失活 (Miyazono 等 (1988) J. Biol. Chem., 263:6407-6415; Wakefield 等 (1988) J. Biol. Chem., 263:7646-7654; 和 Brown 等 (1990) Growth Factors, 3:35-43)。结合 GDF8 或结构上相关的蛋白并抑制其生物活性的其它蛋白包括促滤泡素抑制素和潜在地促滤泡素抑制素相关蛋白 (Gamer 等 (1999) Dev. Biol., 208:222-232)。

[0074] 生长和分化因子 11 (GDF11), 也被称为 BMP11, 为分泌蛋白 (McPherron 等, 1999, Nat. Genet. 22:260-264)。GDF11 在小鼠发育期间表达于尾芽、肢芽、上颌弓和下颌弓以及背根神经节 (Nakashima 等, 1999, Mech. Dev. 80:185-189)。GDF11 在中胚层和神经组织两者的图式形成中发挥独特作用 (Gamer 等, 1999, Dev Biol., 208:222-32)。GDF11 被证明为发育中的鸡肢的软骨发生和肌发生的负调节剂 (Gamer 等, 2001, Dev Biol. 229:407-20)。GDF11 在肌肉中的表达也表明其以与 GDF8 类似的方式调节肌肉生长的作用。另外,GDF11 在脑中的表达表明 GDF11 也可具有与神经系统的功能相关的活性。有趣的是,发现 GDF11 抑制嗅上皮的神经发生 (Wu 等, 2003, Neuron. 37:197-207)。因此,GDF11

可能在疾病（例如肌病和神经变性疾病（例如肌萎缩侧索硬化））的治疗中具有体外和体内应用。

[0075] 在某些方面，本发明涉及将某些 ActRIIB 多肽用于一般地在与 ActRIIB 活性相关的任何过程中拮抗 ActRIIB 配体的信号转导。任选本发明的 ActRIIB 多肽可拮抗一种或多种 ActRIIB 受体的配体，例如激活素、Nodal、GDF8、GDF11 和 BMP7，并因此可用于其它病症的治疗。

[0076] 因此，本发明考虑利用 ActRIIB 多肽治疗或预防与 ActRIIB 或 ActRIIB 配体的异常活性相关的疾病或病况。ActRIIB 或 ActRIIB 配体涉及许多重要的生物过程的调节。由于其在这些过程中的关键功能，它们可作为治疗干预的所需靶标。例如 ActRIIB 多肽（例如 ActRIIB-Fc 多肽）可用于治疗人或动物的病症或病况。此类病症或病况的实例包括但不限于代谢病症，例如 2 型糖尿病、葡萄糖耐量降低、代谢综合征（例如 X 综合征）、以及创伤（例如烧伤或氮不平衡）诱发的胰岛素抵抗；脂肪组织病症（例如肥胖症）；肌肉和神经肌肉病症例如肌营养不良（包括杜兴肌营养不良）；肌萎缩侧索硬化（ALS）；肌肉萎缩；器官萎缩；虚弱；腕管综合征；充血性阻塞性肺病；肌肉衰减综合征、恶病质和其它肌肉消耗综合征。其它的实例包括骨质疏松症，特别在老年女性和 / 或绝经后女性中；糖皮质激素诱发的骨质疏松症；骨质减少；骨关节炎；和骨质疏松症相关的骨折。另外的实例包括由长期的糖皮质激素治疗引起的低骨量、性腺早衰、雄激素抑制、维生素 D 缺乏症、继发性甲状旁腺功能亢进、营养缺乏和神经性厌食症。这些病症和病况在以下的“示例性治疗应用”中论述。如所提及的，本文公开的截短的 ActRIIB 多肽似乎对代谢参数具有特别有益的作用。

[0077] 在本发明的上下文以及在使用各个术语的具体上下文中，用于本说明书的术语一般具有其在本领域的一般含义。下文或本说明书其它部分论述某些术语，以在描述本发明的组合物和方法以及如何制备和使用所述组合物和方法时，对从业人员提供额外的指导。术语任何用法的范围或含义从使用术语的具体上下文来看将是显而易见的。

[0078] “约”和“大约”总的来讲应意指给定测量的性质或精度，对所测定的量的可接受的误差度。示例性误差度通常在给定值或值的范围的 20%、优选 10%、更优选 5% 内。

[0079] 或者，特别是在生物系统中，术语“约”和“大约”可意指在给定值的数量级以内、优选 5 倍以内、更优选 2 倍以内的值。本文给出的数值的量是近似值，除非另有说明，意指在未明确表示时可表示术语“约”或“大约”。

[0080] 本发明的方法可包括将序列彼此进行比较的步骤，包括野生型序列与一个或多个突变型（序列变体）比较。这类比较通常包括多聚体序列的比对，例如应用本领域熟知的序列比对程序和 / 或算法（例如 BLAST、FASTA 和 MEGALIGN 等）。技术人员可容易理解的是，在其中突变含有残基插入或缺失的这类比对中，序列比对可在不含插入残基或缺失残基的多聚体序列中引入“空位”（通常用破折号或“A”表示）。

[0081] 在所有其语法形式和拼法变化中的“同源的”，是指具有“共同进化起源”的两种蛋白质之间的关系，包括来源于同一生物物种超家族的蛋白质以及来源于不同生物物种的同源蛋白质。这类蛋白质（及其编码核酸）具有序列同源性，正如其序列相似性所反映的一样，不论就百分比同一性而言，或者就特定残基或基序和保守位置的存在情况而论。

[0082] 在所有其语法形式中的术语“序列相似性”是指可能有或没有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或一致性程度。

[0083] 然而,在普通用法以及在本申请中,术语“同源的”当用副词(例如“高度地”)修饰时,可以是指序列相似性,并且可与共同进化起源有关或无关。

[0084] 2. ActRIIB 多肽

[0085] 在某些方面,本发明涉及 ActRIIB 多肽(例如 ActRIIB-Fc 多肽),具体地由包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-131 的多肽示例的截短形式及其变体。任选所述片段、功能变体和修饰形式具有其相应野生型 ActRIIB 多肽相似或相同的生物学活性。例如本发明的 ActRIIB 变体可结合 ActRIIB 配体(例如激活素 A、激活素 AB、激活素 B、Nodal、GDF8、GDF11 或 BMP7)并抑制其功能。任选 ActRIIB 多肽调节组织(例如骨、软骨、肌肉或脂肪)的生长或代谢参数例如甘油三酯、游离脂肪酸或胰岛素。ActRIIB 多肽的实例包括人 ActRIIB 前体多肽(SEQ ID NO:1)和 Fc 融合蛋白例如 SEQ ID No. 3 和 8。可依照以下指导作出对这些多肽的变化。ActRIIB 多肽的氨基酸编号基于 SEQ ID NO:1 的序列,不论是否使用天然前导序列。

[0086] 本公开内容鉴定了 ActRIIB 的功能活性部分和变体。本申请人确定具有由 Hilden 等(Blood. 1994 年 4 月 15 日;83(8):2163-70)公开的序列的 Fc 融合蛋白(其在 SEQ ID NO:1 的氨基酸 64 的相应位置上具有丙氨酸(A64)),对激活素和 GDF-11 具有相对低的亲和力。通过比较,在 64 位具有精氨酸(R64)的同一 Fc 融合蛋白对激活素和 GDF-11 具有低纳摩尔至高微微摩尔范围的亲和力。因此,具有 R64 的序列用作本公开内容中人 ActRIIB 的野生型参考序列。

[0087] Attisano 等(Cell. 1992 年 1 月 10 日;68(1):97-108)显示了 ActRIIB 胞外域的 C 端的脯氨酸节(proline knot)的缺失减少受体对激活素的亲和力。P129 和 P130 的突变基本上不减少配体结合。

[0088] ActRIIB 配体结合袋由残基 Y31、N33、N35、L38 到 T41、E47、E50、Q53 到 K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78 到 N83、Y85、R87、A92 和 E94 到 F101 来界定。在这些位置,预期保守突变将是耐受的,尽管 K74A 突变是良好耐受的, R40A、K55A、F82A 和 L79 位的突变亦是如此。R40 在非洲蟾蜍(Xenopus)中为 K,提示该位置的碱性氨基酸将是耐受的。Q53 在牛 ActRIIB 中为 R 而在非洲蟾蜍 ActRIIB 中为 K,因此在此位置包括 R、K、Q、N 和 H 在内的氨基酸将是耐受的。因此 ActRIIB 蛋白可为以下蛋白,其包含氨基酸 25-131 并包含配体结合袋中不超过 1、2、5、10 或 15 个保守氨基酸改变和配体结合袋中在 40、53、55、74、79 和 / 或 82 位的 0 个、一个或多个非保守改变。此类蛋白可保持与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 25-131 的序列多于 80%、90%、95%或 99%的序列同一性。结合袋外的位点(在该处的变异性可以是特别良好耐受的),包括胞外域的氨基端和羧基端(如上所示)以及 42-46 位和 65-73 位。65 位从天冬酰胺向丙氨酸的改变(N65A)实际上改进 A64 背景的配体结合,并因此预期对 R64 背景的配体结合不具有不利影响。该改变在 A64 背景中很可能剔除 N65 的糖基化,因此证明该区的明显改变很可能是耐受的。虽然 R64A 改变耐受不佳,但 R64K 是良好耐受的,因此另一种碱性残基例如 H 可在 64 位被耐受。

[0089] ActRIIB 在接近所有脊椎动物之中是良好保守的,其中大段胞外域是完全保守的。与 ActRIIB 结合的许多配体也是高度保守的。因此,来自不同脊椎动物生物体的 ActRIIB 序列的对比提供可改变的残基的见识。因此,有活性的人 ActRIIB 可在相应位置包含来自另一种脊椎动物 ActRIIB 的序列的一个或多个氨基酸,或者可包含与人或其它脊椎动物序

列中的残基相似的残基。以下实例阐述了这种界定有活性的 ActRIIB 变体的方法。L46 在非洲蟾蜍 ActRIIB 中为缬氨酸,因此该位置可被改变并任选可被改变成另一疏水残基例如 V、I 或 F,或者非极性残基例如 A。E52 在非洲蟾蜍中为 K,提示该位点可耐受很多改变,包括极性残基例如 E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y 以及很可能的 A。T93 在非洲蟾蜍中为 K,提示该位置耐受宽广的结构改变,其中偏爱极性残基例如 S、K、R、E、D、H、G、P、G 和 Y。F108 在非洲蟾蜍中为 Y,因此 Y 或其它的疏水基团例如 I、V 或 L 应为耐受的。E111 在非洲蟾蜍中为 K,提示该位置处耐受带电残基,包括 D、R、K 和 H 以及 Q 和 N。R112 在非洲蟾蜍中为 K,提示该位置处耐受碱性残基,包括 R 和 H。119 位的 A 保守性相对差,并在啮齿类动物中表现为 P 和在非洲蟾蜍中表现为 V,因此基本上任何氨基酸在该位置上应是耐受的。

[0090] 另外的 N 联糖基化位点 (N-X-S/T) 可添加至 ActRIIB 多肽,并且可相对于 ActRIIB(R64)-Fc 形式增加 ActRIIB-Fc 融合蛋白的血清半衰期。NX(T/S) 序列的实例见 42-44(NQS) 和 65-67(NSS),尽管后者在 64 位的 R 的情况下可能不被有效糖基化。N-X-S/T 序列一般可在配体结合袋之外的位置引入。对于非内源性 N-X-S/T 序列的引入特别合适的位点包括氨基酸 20-29、20-24、22-25、109-134、120-134 或 129-134。N-X-S/T 序列还可引入在 ActRIIB 序列和 Fc 或其它的融合组分之间的接头。此类位点可以最小努力通过在针对预先存在的 S 或 T 的正确位置中引入 N 来引入,或者通过在预先存在的 N 对应的位置处引入 S 或 T 来引入。因此,产生 N 联糖基化位点的所需改变为:A24N、R64N、S67N(可能与 N65A 改变结合)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S 和 R112T。因为糖基化给予的保护,预测被糖基化的任何 S 可改变成 T,而不产生免疫原性位点。同样,预测被糖基化的任何 T 可改变成 S。因此考虑改变 S67T 和 S44T。同样,在 A24N 变体中,可利用 S26T 改变。因此,ActRIIB 变体可包含一个或多个另外的非内源性 N 联糖基化共有序列。

[0091] 所述变化可以不同方式结合。此外,ActRIIB 中存在常常有益于保守性的氨基酸位置。这些包括 64 位(碱性氨基酸)、80 位(酸性或疏水氨基酸)、78 位(疏水的,并且特别地色氨酸)、37 位(酸性,并且特别地天冬氨酸或谷氨酸)、56 位(碱性氨基酸)、60 位(疏水氨基酸,特别地苯丙氨酸或酪氨酸)。可为保守所需要的其它位置如下:52 位(酸性氨基酸)、55 位(碱性氨基酸)、81 位(酸性)、98 位(极性 or 带电,特别是 E、D、R 或 K)。

[0092] 在某些实施方案中,为了诸如提高治疗功效或稳定性(例如离体保存期限和体内蛋白水解降解抗性)等目的,本发明考虑通过修饰 ActRIIB 多肽的结构来产生功能变体。修饰的 ActRIIB 多肽还可通过例如氨基酸取代、缺失或添加来产生。例如,有理由预期,亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸单独置换、天冬氨酸被谷氨酸单独置换、苏氨酸被丝氨酸单独置换,或者氨基酸被结构上相关的氨基酸进行类似置换(例如保守突变)将不会对所得分子的生物活性产生重大影响。保守置换是发生在其侧链上是相关的氨基酸家族内的置换。可通过评价变体 ActRIIB 多肽以类似于野生型 ActRIIB 多肽的方式在细胞中产生反应的能力,或者以与野生型相似的方式与一种或多种配体例如激活素、GDF-11 或肌肉生长抑制素结合的能力,来容易地确定 ActRIIB 多肽的氨基酸序列的改变是否产生功能同源物。

[0093] 在某些特定的实施方案中,本发明考虑在 ActRIIB 多肽的胞外域(也被称作配体结合域)中作出突变,使得变体(或突变型)ActRIIB 多肽具有改变的配体结合活性(例如结合亲和力或结合特异性)。在某些情况下,此类变体 ActRIIB 多肽对特定配体具有改变的(提高或减少的)结合亲和力。在其它情况下,变体 ActRIIB 多肽对其配体具有改变的

结合特异性。

[0094] 在某些实施方案中,本发明考虑 ActRIIB 多肽的特定突变以改变多肽的糖基化。可选择这类突变,使得引入或删除一个或多个糖基化位点,例如 O 联糖基化位点或 N 联糖基化位点。天冬酰胺连接的糖基化识别位点一般包含被合适的细胞糖基化酶特异性识别的三肽序列,即天冬酰胺 -X- 苏氨酸(其中“X”为任何氨基酸)。还可通过添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基至野生型 ActRIIB 多肽的序列(对于 O 联糖基化位点),或者用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代野生型 ActRIIB 多肽的序列来作出改变。在糖基化识别位点第一或第三氨基酸位置的一个或两个上的各种氨基酸取代或缺失(和/或在第二位置上的氨基酸缺失)在修饰三肽序列上导致非糖基化。在 ActRIIB 多肽上增加糖部分的数目的另一种方法是将糖苷与 ActRIIB 多肽化学偶联或酶促偶联。根据所采用的偶联方式,可将糖连接至:(a) 精氨酸和组氨酸;(b) 游离羧基;(c) 游离巯基,例如半胱氨酸的巯基;(d) 游离羟基,例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基;(e) 芳族残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基;或(f) 谷氨酰胺的酰胺基。这些方法参见 1987 年 9 月 11 日公布的 W087/05330 以及 Aplin 和 Wriston(1981)CRC Crit. Rev. Biochem., 第 259-306 页,通过引用结合到本文中。可用化学方法和/或酶方法实现 ActRIIB 多肽上存在的一个或多个糖部分的脱去。化学去糖基化可包括例如将 ActRIIB 多肽暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等同化合物中。这种处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺)以外的大部分或所有糖被切割,同时保持氨基酸序列完整。化学去糖基化另参见 Hakimuddin 等(1987)Arch. Biochem. Biophys. 259:52 和 Edge 等(1981)Anal. Biochem. 118:131。ActRIIB 多肽上的糖部分的酶促切割可通过使用各种内切糖苷酶和外切糖苷酶完成,参见 Thotakura 等(1987)Meth. Enzymol. 138:350。适当时,可根据所采用的表达系统类型,调整 ActRIIB 多肽的序列,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可引入可受所述肽的氨基酸序列影响的不同糖基化模式。一般而言,用于人的 ActRIIB 蛋白可在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系(例如 HEK293 或 CHO 细胞系)中表达,虽然预期其它的哺乳动物表达细胞系也是有用的。

[0095] 本公开内容还考虑产生变体、特别是数套 ActRIIB 多肽的组合变体包括任选截短变体的方法;组合突变型库尤其可用于鉴定功能变体序列。筛选这类组合文库的目的可以是产生例如具有改变的性质(例如改变的药代动力学或改变的配体结合)的 ActRIIB 多肽变体。下面提供各种筛选测定法,这类测定法可用来评价变体。例如,可针对与 ActRIIB 多肽结合的能力筛选 ActRIIB 多肽变体,以防止 ActRIIB 配体与 ActRIIB 多肽结合。

[0096] 还可以在基于细胞的测定法或体内测定法中测试 ActRIIB 多肽或其变体的活性。例如,可对 ActRIIB 多肽变体对成骨细胞或前体中参与骨产生的基因的表达的作用进行评价。这可根据需要在一种或多种重组 ActRIIB 配体蛋白(例如 BMP7)存在下进行,可以转染细胞以产生 ActRIIB 多肽和/或其变体,任选 ActRIIB 配体。同样,可将 ActRIIB 多肽给予小鼠或其它动物,并可评价一种或多种骨性质,例如密度或体积。还可以评价骨折的愈合速度。类似地,可在肌细胞、脂肪细胞和神经元细胞中通过例如上述测定法检测 ActRIIB 多肽或其变体对这些细胞的生长的任何影响的活性。这类测定法是本领域众所周知和常规的。此类细胞系中可采用 SMAD 响应性报告基因以监测对下游信号转导的影响。

[0097] 可以制备相对于天然存在的 ActRIIB 多肽具有选择性潜能的组合衍生的变体。此类变体蛋白,当从重组 DNA 构建体表达时,可用于基因疗法方案中。同样,诱变可产生与相

应的野生型 ActRIIB 多肽相比胞内半衰期十分不同的变体。例如,对于蛋白水解降解或者导致天然 ActRIIB 多肽破坏或以其它方式失活的其它过程,经改变的蛋白质可更稳定或更不稳定。可利用这类变体和编码所述变体的基因,以通过调节 ActRIIB 多肽的半衰期改变 ActRIIB 多肽水平。例如,短的半衰期可产生更短暂的生物作用,并且当作为诱导型表达系统的部分时,短的半衰期可允许更严格控制细胞内的重组 ActRIIB 多肽水平。

[0098] 在某些实施方案中,除天然存在于 ActRIIB 多肽中的任何修饰以外,本发明的 ActRIIB 多肽还可包含翻译后修饰。这类修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。因此,修饰的 ActRIIB 多肽可含有非氨基酸成分,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖和磷酸酯。可按照本文有关其它 ActRIIB 多肽变体方面所述,测试这类非氨基酸成分对 ActRIIB 多肽的功能性的影响。如果 ActRIIB 多肽在细胞中通过切割 ActRIIB 多肽的新生形式产生,则翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和 / 或功能亦可为重要的。对于这类翻译后活性,不同的细胞 (例如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293) 具有特定的细胞机器和特有机制,可选择不同的细胞以确保 ActRIIB 多肽的正确修饰和加工。

[0099] 在某些方面,ActRIIB 多肽的功能变体或修饰形式包括具有 ActRIIB 多肽的至少一部分和一个或多个融合结构域的融合蛋白。这类融合结构域的众所周知的实例包括但不限于聚组氨酸、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 (例如 Fc)、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 或人血清白蛋白。可选择融合结构域以提供所需性质。例如,一些融合结构域特别可用于通过亲和层析法分离融合蛋白。为了亲和纯化的目的,使用用于亲和层析法的相关基质,例如谷胱甘肽缀合树脂、淀粉酶缀合树脂和镍缀合树脂或钴缀合树脂。这类基质的许多种可以“试剂盒”形式获得,例如 Pharmacia GST 纯化系统和可与 (HIS₆) 融合配偶体一起使用的 QIAexpress™ 系统 (Qiagen)。作为另一个实例,可选择融合结构域以促进 ActRIIB 多肽的检测。这类检测结构域的实例包括各种荧光蛋白 (例如 GFP) 以及“表位标签”,其通常是短肽序列,可获得其特异性抗体。易获得其特异性单克隆抗体的众所周知的表位标签包括 FLAG、流感病毒血凝素 (HA) 和 c-myc 标签。在一些情况下,融合结构域具有例如因子 Xa 或凝血酶的蛋白酶切割位点,其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白,从而从中释放重组蛋白。然后,可通过随后的层析分离,从融合结构域分离出释放的蛋白质。在某些优选的实施方案中,ActRIIB 多肽与体内稳定 ActRIIB 多肽的结构域 (“稳定剂”结构域) 融合。所谓“稳定”意指延长血清半衰期的任何方法,不论这是否是因为破坏减少、肾清除率降低或其它药代动力学作用。已知与免疫球蛋白的 Fc 部分的融合物赋予多种蛋白质所需要的药代动力学性质。同样,与人血清白蛋白的融合物可赋予所需要的性质。可选择的融合结构域的类型,包括多聚化 (例如二聚化、四聚化) 结构域和功能结构域 (赋予其它生物功能,例如进一步刺激肌肉生长)。

[0100] 作为具体实例,本发明提供包含与 Fc 结构域 (例如 SEQ ID NO:9) 融合的胞外 (例如结合 GDF8 的) 结构域的融合蛋白作为 GDF8 拮抗剂。

[0101] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK *

[0102] 任选 Fc 结构域在例如 Asp-265、赖氨酸 322 和 Asn-434 残基上具有一个或多个突

变。在某些情况下,与野生型 Fc 结构域相比,具有这些突变的一个或多个(例如 Asp-265 突变)的突变型 Fc 结构域与 Fc γ 受体结合的能力降低。在其它情况下,与野生型 Fc 结构域相比,具有这些突变的一个或多个(例如 Asn-434 突变)的突变型 Fc 结构域与 MHC I 类相关 Fc 受体 (FcRN) 结合的能力提高。

[0103] 要理解的是,融合蛋白的不同组分可以与所需功能性一致的任何方式排列。例如,可将 ActRIIB 多肽置于异源结构域的 C 端,或者,可将异源结构域置于 ActRIIB 多肽的 C 端。ActRIIB 多肽结构域和异源结构域在融合蛋白中不一定邻接,在任一结构域的 C 端或 N 端或者在结构域之间可包括其它结构域或氨基酸序列。

[0104] 在某些实施方案中,本发明的 ActRIIB 多肽含有能够稳定 ActRIIB 多肽的一种或多种修饰。例如,这类修饰延长 ActRIIB 多肽的体外半衰期、延长 ActRIIB 多肽的循环半衰期或降低 ActRIIB 多肽的蛋白水解降解。这类稳定修饰包括但不限于融合蛋白(包括例如包含 ActRIIB 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加至 ActRIIB 多肽上)和糖部分的修饰(包括例如从 ActRIIB 多肽中脱去糖部分)。在融合蛋白的情况下,ActRIIB 多肽与稳定剂结构域(例如 IgG 分子(例如 Fc 结构域))融合。本文使用的术语“稳定剂结构域”不仅仅是指融合蛋白的情况下的融合结构域(例如 Fc),而且还包括非蛋白质修饰(例如糖部分)或非蛋白质聚合物(例如聚乙二醇)。

[0105] 在某些实施方案中,本发明可获得 ActRIIB 多肽的分离和/或纯化形式,其与其它蛋白酶分离或者基本上不含其它蛋白质。

[0106] 在某些实施方案中,本发明的 ActRIIB 多肽(未修饰或修饰的)可通过各种本领域已知的技术产生。例如,此类 ActRIIB 多肽可利用标准的蛋白质化学技术(例如描述于以下文献中的技术:Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin(1993) 和 Grant G. A. (编辑), Synthetic Peptide: A User's Guide, W. H. Freeman 和 Company, New York(1992)) 来合成。另外,自动肽合成仪是市售的(例如 Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。或者,ActRIIB 多肽、其片段或变体可利用本领域众所周知的各种表达系统(例如大肠杆菌、中国仓鼠卵巢细胞、COS 细胞、杆状病毒)重组产生(亦参见以下)。在另一个实施方案中,修饰或未修饰的 ActRIIB 多肽可通过利用例如蛋白酶(例如胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶或配对的碱性氨基酸转化酶(PACE))消化天然存在或重组产生的全长 ActRIIB 多肽来产生。计算机分析(利用市售软件,例如 MacVector、Omega、PCGene、Molecular Simulation, Inc.)可用于鉴定蛋白酶剪切位点。或者,可例如通过本领域已知的标准技术例如通过化学裂解(例如溴化氰、羟胺)从天然存在或重组产生的全长 ActRIIB 多肽产生此类 ActRIIB 多肽。

[0107] 3. 编码 ActRIIB 多肽的核酸

[0108] 在某些方面,本发明提供编码本文公开的任何 ActRIIB 多肽的分离核酸和/或重组核酸。例如,SEQ ID NO:4 编码 ActRIIB(25-131)-hFc 前体多肽,而 SEQ ID NO:6 编码相同蛋白质但具有备选序列,SEQ ID No. 4 和 6 各自的核苷酸 73-396 编码所编码蛋白质的 ActRIIB 衍生部分。主题核酸可呈单链或双链。这类核酸可以是 DNA 或 RNA 分子。这些核酸可用于例如用于制备 ActRIIB 多肽的方法中。

[0109] 例如,以下序列编码天然存在的人 ActRIIB 前体多肽 (SEQ ID NO:2) (NM_001106 的核苷酸 5-1543, 1539bp) :

[0110] atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtctgggcgtggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgctg
cgaaggcgagcaggacaagcggtgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaaga
agggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtac
ttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcactcatttgccagaggctggggggccggaagtcacgta
cgagccacccccgacagccccaccctgctcacggtgctggcctactcactgctgcccatcgggggcctttccctca
tcgtcctgctggccttttggatgtaccggcatcgcaagccccctacggcatgtggacatccatgaggaccctggg
cctccaccaccatccccctctgggtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctg
tgtctggaaggccagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcaga
gtgaacgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcattgctgccgagaagcgaggc
tccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattacctcaagggaa
catcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctcatacctgcatgaggatgtgc
cctggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgccacagggactttaaaagtaagaatgtattgctgaagagc
gacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcgatttgagccagggaacctccaggggacaccacgg
acaggtaggcacgagacggtacatggctcctgaggtgctcgaggagccatcaacttcagagagatgccttcctgc
gcattgacatgtatgccatggggttgggtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggaccctggat
gagtacatgctgccctttgaggaagagattggccagcacccttcgttgaggagctgcaggaggtggtggtgcacaa
gaagatgaggcccaccattaaagatcactggttgaaacacccgggcctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagt
gctgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtgtggaggagcgggtgtccctgattcgagggtcggtc
aacggcactacctcgactgtctcgtttccctgggtgacctctgtcaccaatgtggacctgccccctaaagagtcaag
catctaa

[0111] 以下序列编码人可溶性（胞外）ActRIIB 多肽（SEQ ID NO:10）（348bp）。

[0112] tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcacc
aaccagagcggcctggagcgtgcaaggcgagcaggacaagcggtgcactgctacgcctcctggcgcaacagctc
tggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcca
ctgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcactcatttgccagag
gctggggggccggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccacc

[0113] 在某些方面，编码 ActRIIB 多肽的主题核酸还理解为包括 SEQ ID NO:4 或 6 的变体的核酸。变体核苷酸序列包括因一个或多个核苷酸取代、添加或缺失而不同的序列，例如等位基因变体；并且因此，包括不同于 SEQ ID NO:4 或 6 中指定的编码序列的核苷酸序列的编码序列。

[0114] 在某些实施方案中，本发明提供与 SEQ ID NO:4 或 6 有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的分离核酸序列或重组核酸序列，以及尤其是其来源于 ActRIIB（核苷酸 73-396）的那些部分。本领域普通技术人员应理解的是，与 SEQ ID NO:4 或 6 互补的核酸序列以及 SEQ ID NO:4 的变体也在本发明的范围内。在另外的实施方案中，本发明的核酸序列可被分离、重组和 / 或与异源核苷酸序列融合，或者存在于 DNA 文库中。

[0115] 在其它实施方案中，本发明的核酸还包括以下核苷酸序列，其在高严格条件下与 SEQ ID NO:4 或 6 所指定的核苷酸序列、SEQ ID NO:4 或 6 的互补序列或者其片段（例如核苷酸 73-396）杂交。如上所述，本领域的普通技术人员应容易地理解的是，可以改变促进

DNA 杂交的适当严格性条件。本领域的普通技术人员应容易地理解的是,可以改变促进 DNA 杂交的适当严格性条件。例如,可在 6.0x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 下于约 45℃ 进行杂交,接着 2.0x SSC 于 50℃ 洗涤。例如,可从约 2.0x SSC 于 50℃ 的低严格性到约 0.2x SSC 于 50℃ 的高严格性选择洗涤步骤的盐浓度。另外,洗涤步骤的温度可从室温 (约 22℃) 下的低严格性条件提高到约 65℃ 下的高严格性条件。温度和盐两者均可改变,或者可保持温度或盐浓度恒定,而改变另一个变量。在一个实施方案中,本发明提供在 6x SSC 于室温的低严格性条件下杂交接着 2x SSC 于室温洗涤的核酸。

[0116] 因遗传密码简并而不同于 SEQ ID NO:4 或 6 所示核酸的分离核酸也在本发明的范围内。例如,用不止一个三联体标示多个氨基酸。限定同一氨基酸的密码子或同义密码子 (例如 CAU 和 CAC 是组氨酸的同义密码子),可导致不影响蛋白质的氨基酸序列的“沉默”突变。然而,预期在哺乳动物细胞中可存在确实引起主题蛋白质氨基酸序列改变的 DNA 序列多态性。本领域技术人员应理解的是,由于天然等位基因变化所致,在给定物种的个体之间,可存在编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸 (多至约 3-5% 的核苷酸) 的这些变化。任何和所有这类核苷酸变化和所得氨基酸多态性也在本发明的范围内。

[0117] 在某些实施方案中,在表达构建体中,本发明的重组核酸可与一个或多个调节核苷酸序列有效连接。调节核苷酸序列一般可适于用于表达的宿主细胞。本领域已知用于各种宿主细胞的许多类型的合适表达载体和合适调节序列。所述一个或多个调节核苷酸序列通常可包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列及增强子或激活物序列。本发明考虑本领域已知的组成型启动子或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或将不止一种启动子的元件组合的杂合启动子。表达构建体可存在于细胞的附加体例如质粒上,或者表达构建体可插入染色体中。在优选的实施方案中,表达载体含有选择标记基因以供转化宿主细胞的选择。选择标记基因是本领域众所周知的并且可随所采用的宿主细胞而改变。

[0118] 在本发明的某些方面,在包含编码 ActRIIB 多肽并与至少一个调节序列有效连接的核苷酸序列的表达载体中提供主题核酸。调节序列是本领域公认的,并被选择来直接表达 ActRIIB 多肽。因此,术语调节序列包括启动子、增强子和其它表达调控元件。示例性的调节序列参见 Goeddel ;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如,控制 DNA 序列表达的各种表达调控序列的任一种当与 DNA 序列有效连接时,可用于这些载体以表达编码 ActRIIB 多肽的 DNA 序列。这类有用的表达调控序列包括例如 SV40 的早期启动子和晚期启动子、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、其表达受 T7RNA 聚合酶指导的 T7 启动子、噬菌体 λ 的主要操纵基因和启动子区、fd 外壳蛋白的调控区、3- 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶启动子 (例如 Pho5)、酵母 α - 交配因子启动子、杆状病毒系统的多角体 (polyhedron) 启动子和已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列及其各种组合。应当理解的是,表达载体的设计可取决于以下因素,例如:待转化的宿主细胞的选择和 / 或欲表达的蛋白质类型。此外,还应考虑载体拷贝数、控制该拷贝数的能力和由所述载体编码的任何其它蛋白质例如抗生素标记的表达。

[0119] 本发明的重组核酸可通过将克隆的基因或其部分连接到适于在原核细胞、真核细胞 (酵母、禽、昆虫或哺乳动物) 或两者中表达的载体中来产生。用于产生重组 ActRIIB 多

肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括用于在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的以下类型的质粒:pBR322 衍生质粒、pEMBL 衍生质粒、pEX 衍生质粒、pBTac 衍生质粒和 pUC 衍生质粒。

[0120] 一些哺乳动物表达载体既含有利于载体在细菌中繁殖的原核序列,又含有在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 和 pHyg 衍生载体是适于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些用来源于细菌质粒(例如 pBR322)的序列修饰,以利于在原核细胞和真核细胞两者中复制和进行药物抗性选择。或者,可使用诸如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或埃巴病毒(pHEBo、pREP 衍生物和 p205)等病毒衍生物在真核细胞中瞬时表达蛋白质。其它病毒(包括反转录病毒)表达系统的实例可见下面基因疗法递送系统的描述。用于质粒制备和宿主生物转化中的各种方法是本领域众所周知的。对于原核和真核细胞两者的其它合适的表达系统以及通用重组方法,参见 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编辑 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 16 和 17 章。在某些情况下,可能需要通过利用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这类杆状病毒表达系统的实例包括 pVL 衍生载体(例如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941)、pAcUW 衍生载体(例如 pAcUW1)和 pBlueBac 衍生载体(例如含 β -gal 的 pBlueBac III)。

[0121] 在优选的实施方案中,可设计在 CHO 细胞中产生主题 ActRIIB 多肽的载体,例如 Pcmv-Script 载体(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4 载体(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)和 pCI-neo 载体(Promega, Madison, Wisc.)。显然,可使用主题基因构建体在培养基中繁殖的细胞中使主题 ActRIIB 多肽表达,例如产生蛋白质(包括融合蛋白或变体蛋白)以便纯化。

[0122] 本发明还涉及用重组基因转染的宿主细胞,所述重组基因包括一种或多种主题 ActRIIB 多肽的编码序列(例如 SEQ ID NO:4 或 6)。宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞。例如,可在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如利用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达本发明的 ActRIIB 多肽。其它合适的宿主细胞为本领域技术人员所知。

[0123] 因此,本发明还涉及产生主题 ActRIIB 多肽的方法。例如,可将用编码 ActRIIB 多肽的表达载体转染的宿主细胞培养在合适的条件下以允许表达 ActRIIB 多肽。可使 ActRIIB 多肽分泌并从细胞和含有 ActRIIB 多肽的培养基的混合物中分离出来。或者,可将 ActRIIB 多肽保持在胞质或在膜部分中并将细胞收获、裂解并分离蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产品。用于细胞培养的合适培养基是本领域众所周知的。可采用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术,包括离子交换层析法、凝胶过滤层析法、超滤法、电泳以及使用对 ActRIIB 多肽的特定表位有特异性的抗体进行免疫亲和纯化,将主题 ActRIIB 多肽从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离出来。在优选的实施方案中,ActRIIB 多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0124] 在另一个实施方案中,编码纯化前导序列(例如重组 ActRIIB 多肽的所需部分的 N 端上的聚-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因,可允许使用 Ni^{2+} 金属树脂通过亲和层析法对表达的融合蛋白进行纯化。纯化的前导序列随后可通过肠激酶处理除去,得

到纯化的 ActRIIB 多肽（例如参见 Hochuli 等 (1987) *J. Chromatography* 411:177；以及 Janknecht 等, *PNAS USA* 88:8972）。

[0125] 制备融合基因的技术是众所周知的。基本上，编码不同多肽序列的各种 DNA 片段的连接按照常规技术进行，采用用于连接的平端或交错端，限制性内切酶消化以提供合适末端，适当时补平黏性末端，碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接，并进行酶促连接。在另一个实施方案中，融合基因可通过常规技术合成，包括自动 DNA 合成仪。或者，可使用在两个连续基因片段之间产生互补突出端的锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增，所述基因片段随后可退火得到嵌合基因序列（参见例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel 等编辑, John Wiley&Sons :1992）。

[0126] 5. 示例性治疗应用

[0127] 在某些实施方案中，本发明的组合物（例如 ActRIIB 多肽）可用于治疗或预防与 ActRIIB 多肽和 / 或 ActRIIB 配体（例如 GDF8）的异常活性有关的疾病或病况。这些疾病、病症或病况一般在本文被称作“ActRIIB 相关病况”。在某些实施方案中，本发明提供通过给予有需要的个体治疗有效量的如所所述的 ActRIIB 多肽治疗或预防所述个体的方法。这些方法尤其旨在动物（并且更特别地，人）的治疗和预防性治疗。

[0128] 本文使用的“预防”病症或病况的治疗药是指以下化合物，其在统计样本中，与未治疗对照样品相比，减少治疗样品中的病症或病况的发生，或者与未治疗对照样品相比，延缓病症或病况的一种或多种症状发作或者降低病症或病况的一种或多种症状的严重程度。本文所用术语“治疗”包括指定病况的预防或者病况一旦确立便改善或根除病况。

[0129] ActRIIB/ActRIIB 配体复合体在组织生长及早期发育过程例如各种结构的正确形成或者一种或多种发育期后能力包括性发育、垂体激素的产生和骨和软骨的形成中发挥重要作用。因此，ActRIIB 相关病况包括异常的组织生长和发育性缺陷。此外，ActRIIB 相关病况包括但不限于细胞生长和分化的病症例如炎症、变态反应、自身免疫性疾病、传染性疾病和肿瘤。

[0130] 用于治疗示例性病况包括：神经肌肉病症（例如肌营养不良和肌肉萎缩）、充血性阻塞性肺病（和与 COPD 相关的肌肉消耗）、肌肉消耗综合征、肌肉衰减综合征、恶病质、脂肪组织病症（例如肥胖症）、2 型糖尿病和骨变性疾病（例如骨质疏松症）。其它的示例性病况包括肌肉变性病症和神经肌肉病症、组织修复（例如伤口愈合）、神经变性疾病（例如肌萎缩侧索硬化）、免疫学病症（例如与淋巴细胞的异常增殖或异常功能相关的病症）以及肥胖症或与脂肪细胞的异常增殖相关的病症。

[0131] 在某些实施方案中，本发明的组合物（例如，ActRIIB-Fc 多肽）用作肌营养不良治疗的一部分。术语“肌营养不良”是指特征在于骨骼肌和有时为心肌和呼吸肌的逐渐衰弱和恶化的一组变性性肌肉疾病。肌营养不良为特征在于以肌肉的微观变化开始的进行性肌肉消耗和衰弱的遗传病。随着肌肉随时间推移退化，人的肌力下降。可用包含主题 ActRIIB 多肽的方案治疗的示例性肌营养不良包括：杜兴肌营养不良（DMD）、贝克尔肌营养不良（BMD）、埃-德肌营养不良（EDMD）、肢带肌营养不良（LGMD）、面肩胛肱骨肌营养不良（FSH 或 FSHD）（又称为 Landouzy-Dejerine）、强直性营养不良（MMD）（又称为 Steinert 病）、眼咽肌营养不良（OPMD）、远端肌营养不良（DD）和先天性肌营养不良（CMD）。

[0132] 杜兴肌营养不良（DMD）最先被法国神经学家 Guillaume Benjamin Amand

Duchenne 在 19 世纪 60 年代描述。贝克尔肌营养不良 (BMD) 以最先在 20 世纪 50 年代描述 DMD 的该变体的德国医生 Peter Emil Becker 来命名。DMD 是男性最常见的遗传病之一, 3500 个男孩中就有一个受其影响。当位于 X 染色体短臂的肌养蛋白基因断裂时就会发生 DMD。由于男性只携带 X 染色体的一个拷贝, 他们仅具有肌养蛋白基因的一个拷贝。没有肌养蛋白蛋白时, 肌肉在收缩和松弛周期期间容易受损。虽然在疾病早期肌肉通过再生补偿, 但之后肌肉祖细胞无法跟上持续伤害并且健康的肌肉被无功能的纤维脂肪组织所替代。

[0133] BMD 由肌养蛋白基因的不同突变引起。BMD 患者具有一些肌养蛋白, 但其要么量不足, 要么质量差。具有一些肌养蛋白使患 BMD 的那些人的肌肉免受如患 DMD 的人的肌肉那样严重或快速地变性。

[0134] 例如, 近来的研究证明阻断或消除体内 GDF8 (ActRIIB 配体) 的功能可有效地治疗 DMD 和 BMD 患者的至少某些症状。因此, 主题 ActRIIB 多肽可充当 GDF8 抑制剂 (拮抗剂) 并组成阻断 DMD 和 BMD 患者的体内 GDF8 和 / 或 ActRIIB 的功能的备选方法。该方法由本文所示的数据所确证并支持, 其中 ActRIIB-Fc 蛋白在肌营养不良的小鼠模型中显示出增加肌肉质量。

[0135] 类似地, 在需要肌肉生长的其它疾病情况中主题 ActRIIB 多肽提供增加肌肉质量的有效方法。例如, ALS, 也称为 Lou Gehrig 病 (运动神经元疾病) 是一种慢性、无法医治并且不可阻挡的攻击运动神经元的 CNS 病症, 运动神经元为连接脑与骨骼肌的 CNS 组分。在 ALS 中, 运动神经元恶化并最终死亡, 尽管人脑正常地保持完全有功能且活跃, 但移动的命令永远不会到达肌肉。患 ALS 的大多数人在 40-70 岁。衰弱的第一运动神经元通向手臂或腿。患 ALS 的那些人可能在行走方面有困难, 他们可能掉东西、跌倒、口齿不清并且无法控制地笑或哭。最终四肢肌肉从不被使用向萎缩进行。该肌肉的衰弱使人衰弱并且人将需要轮椅或变得无法下床。自疾病发病 3-5 年, 大多数 ALS 患者死于呼吸衰竭或呼吸器辅助的并发症如肺炎。该方法由本文所示的数据所确证并支持, 其中 ActRIIB-Fc 蛋白显示改善 ALS 小鼠模型的外型、肌肉质量和寿命。

[0136] ActRIIB 多肽诱导的肌肉质量增加也可有益于遭受肌肉消耗疾病的那些。Gonzalez-Cadavid 等 (见上文) 报道, GDF8 的表达与人的无脂肪质量呈负相关并且 GDF8 基因的表达增加与患 AIDS 消耗综合征的男性的体重减少相关。通过抑制 AIDS 患者中 GDF8 的功能, 即使不能完全根治但可缓解 AIDS 的至少某些症状, 因此显著改善 AIDS 患者的生活质量。

[0137] 由于 GDF8 (ActRIIB 配体) 功能的丢失还与无营养摄入缩减的脂肪丢失相关 (Zimmers 等, 见上文; McPherron 和 Lee, 见上文), 主题 ActRIIB 多肽还可用作治疗药用于减缓或阻止肥胖症和 II 型糖尿病的发展。该方法由本文所示的数据所确证并支持, 其中 ActRIIB-Fc 蛋白显示出改善肥胖小鼠的代谢状态。

[0138] 在某些实施方案中, 本发明的组合物 (ActRIIB 多肽) 用作代谢综合征 (也被称作 X 综合征和胰岛素抵抗综合征) 的治疗的一部分, 该综合征是增加罹患心血管疾病和 II 型糖尿病的风险的病症和风险因素的组合。大多数患者为年长、肥胖、久坐的并具有一定程度的胰岛素抵抗。向心性 (腹部或内脏) 肥胖是该综合征的重要特征。

[0139] 在相关实施方案中, 本发明的 ActRIIB 多肽和其它组合物可用作治疗 II 型糖尿病 (也被称作非胰岛素依赖型糖尿病或成年发病型糖尿病) 的一部分, 该疾病的特征在于在

胰岛素抵抗和相对胰岛素缺乏的背景下升高的血糖。糖尿病中复杂和多因素代谢改变常导致许多器官、最重要地心血管系统的损伤和功能障碍。II 型糖尿病往往与肥胖症（腹部或内脏肥胖）、高血压、高胆固醇和代谢综合征相关。II 型糖尿病的重要风险因素包括老化、高脂饮食和久坐的生活方式。

[0140] 在其它相关实施方案中，本发明的 ActRIIB 多肽和其它组合物可用于治疗动脉粥样硬化的一部分，其是其中由于脂肪沉积（常被称作斑）的累积使血管壁增厚的慢性炎症。动脉粥样硬化的风险因素包括衰老、糖尿病、异常脂蛋白血症、肥胖症（腹部肥胖）和久坐的生活方式。

[0141] ActRIIB 多肽也可用于脂肪代谢障碍 (lipodystrophic disorder)，其易于与代谢综合征相关。严重的胰岛素抵抗可由脂肪代谢障碍的遗传形式和获得性形式两者引起，包括在后一种情况下在抗反转录病毒疗法治疗的患者中的人免疫缺陷病毒 (HIV) 相关的脂肪代谢障碍。

[0142] 癌症厌食 - 恶病质综合征属于癌症中最衰弱并威胁生命的方面。癌症厌食 - 恶病质综合征中的进行性体重减轻是许多类型癌症的共有特征并且不仅是生活质量低下和化疗反应不佳的原因，而且也是具有比无体重减轻的可比拟肿瘤患者短的生存时间的原因。与厌食、脂肪和肌肉组织消耗、心理压力以及较低的生活质量相关的是，恶病质来自于癌症和宿主之间的复杂相互作用。它是癌症患者死亡的最普遍原因之一并占死亡的 80%。其是影响蛋白质、糖和脂肪代谢的代谢紊乱的复杂实例。肿瘤产生直接和间接异常两者，导致厌食和体重减轻。目前，没有控制或逆转该过程的治疗。癌症厌食 - 恶病质综合征影响细胞因子的产生、脂质动员因子和蛋白质水解诱导因子的释放并改变中间代谢。尽管厌食常见，但仅食物摄入减少并不能作为癌症患者中所见的身体组成改变的原因，并且增加营养摄入并不能逆转该消耗综合征。癌症患者如果在 6 个月内发生大于 5% 的病前体重的非自主体重减轻，应怀疑恶病质。

[0143] 由于发现成年小鼠中 GDF8 的全身过表达诱发与人恶病质综合征中所见类似的深度的肌肉和脂肪丢失 (Zimmers 等，见上文)，主题 ActRIIB 多肽作为药物组合物可有益地用于预防、治疗或缓解其中需要肌肉生长的恶病质综合征的症状。

[0144] 在其它实施方案中，本发明提供诱导骨和 / 或软骨形成、防止骨丢失、增加骨矿化或防止骨去矿化的方法。例如本发明中鉴定的主题 ActRIIB 多肽和化合物在人和其它动物中在治疗骨质疏松症和愈合骨折以及软骨缺陷方面具有应用。ActRIIB 多肽可用于诊断为亚临床低骨密度的患者，作为针对骨质疏松症的形成的保护措施。

[0145] 在一个具体的实施方案中，本发明的方法和组合物可在人和其它动物的骨折和软骨缺陷的愈合中具有医疗用途。主题方法和组合物还可在闭合性和开放性骨折复位术以及改进人工关节固定方面具有预防用途。由成骨剂 (osteogenic agent) 诱导的从头骨形成有助于先天性、创伤诱发的或肿瘤切除术诱发的颅面缺陷的修复，并且也可用于美容整形手术。此外，本发明的方法和组合物可用于治疗牙周病以及其它的牙齿修复过程。在某些情况下，主题 ActRIIB 多肽可提供吸引成骨细胞、刺激成骨细胞生长或诱导成骨细胞祖细胞分化的环境。本发明的 ActRIIB 多肽还可用于治疗骨质疏松症。此外，ActRIIB 多肽可用于软骨缺损修复和骨关节炎的预防 / 逆转。

[0146] 在另一个特定实施方案中，本发明提供用于修复骨折及与软骨和 / 或骨缺陷或

牙周病相关的其它病况的治疗方法和组合物。本发明还提供用于伤口愈合和组织修复的治疗方法和组合物。伤口的类型包括但不限于烧伤、切口和溃疡。参见例如 PCT 公布号 W084/01106。此类组合物包含与药学上可接受的溶媒、载体或基质混合的治疗有效量的至少一种本发明 ActRIIB 多肽。

[0147] 在另一个特定实施方案中,本发明的方法和组合物可用于引起骨丢失的病况,例如骨质疏松症、甲状旁腺功能亢进、库欣病 (Cushing's disease)、甲状腺毒症、慢性腹泻状态或吸收不良、肾小管性酸中毒、慢性肾衰竭或神经性厌食症。许多人知道作为女性,体重轻和过着久坐生活方式是骨质疏松症(导致骨折风险的骨矿物质密度丢失)的风险因素。然而,骨质疏松症还可由长期使用某些药物引起。由药物或另一种医学病况引起的骨质疏松症被称为继发性骨质疏松症。在称为库欣病的病况中,由机体产生的过量皮质醇引起骨质疏松症和骨折。与继发性骨质疏松症有关的最普通的药物是皮质甾类,像由肾上腺天然产生的激素皮质醇一样起作用的药物类别。虽然骨骼发育需要适当水平的甲状腺激素(其由甲状腺产生),但过量的甲状腺激素可随时间减少骨质量。当患有肾病的人(特别是经历透析的人)摄入高剂量含有铝的抗酸剂时,可导致骨丢失。可引起继发性骨质疏松症的其它药物包括用于预防癫痫发作的苯妥英 (Dilantin) 和巴比妥类;甲氨蝶呤 (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), 一种用于某些形式的关节炎、癌症和免疫疾病的药物;环孢菌素 (Sandimmune, Neoral), 一种用于治疗一些自身免疫性疾病和抑制器官移植患者的免疫系统的药物;促黄体激素释放激素激动剂 (Lupron、Zoladex), 用于治疗前列腺癌和子宫内膜异位症;肝素 (Calciparine、Liquaemin), 一种抗凝药;以及消胆胺 (Questran) 和考来替泊 (Colestid), 用于治疗高胆固醇。龈疾病导致骨丢失,因为我们口腔中这些有害的细菌迫使我们的机体抵御它们。细菌在龈线下产生毒素和酶,导致慢性感染。

[0148] 在其它的实施方案中,本发明提供用于调节动物中体脂肪含量和用于治疗或预防与其相关的病况并且特别地,与其相关的损害健康的病况的组合物和方法。依照本发明,调节(控制)体重可指减少或增加体重、降低或提高重量增加的速度、或者降低或提高体重减轻的速度,并且还包括积极保持体重,或者不显著改变体重(例如针对可以其它方式增加或减少体重的外部影响或内部影响)。本发明的一个实施方案涉及通过给予有需要的动物(例如人)ActRIIB 多肽来调节体重。

[0149] 在一个特定的实施方案中,本发明涉及用于减少动物的脂肪质量和/或减少动物的脂肪质量的增加并且更特别地,用于治疗或缓解处于肥胖症风险中或患有肥胖症的患者肥胖症的方法和化合物。在另一个特定实施方案中,本发明涉及用于治疗不能增加或保持重量的动物(例如患消耗综合征的动物)的方法和化合物。此类方法对于增加体重和/或质量、或减少重量和/或质量丢失、或者改善与非所需的低(例如不健康的)体重和/或质量相关的病况或由非所需的低体重和/或质量引起的病况是有效的。

[0150] 7. 药物组合物

[0151] 在某些实施方案中,将本发明的化合物(例如 ActRIIB 多肽)与药学上可接受的载体一起配制。例如,ActRIIB 多肽可单独给予或作为药物制剂(治疗组合物)的组分给予。主题化合物可以用于人或兽药的任何适宜的方式配制用于给药。

[0152] 在某些实施方案中,本发明的治疗方法包括局部、全身或者以植入物或装置局部给予组合物。当给药时,用于本发明的治疗组合物当然是无致热原的生理学上可接受的形

式。另外,组合物可以黏性形式合意地装入胶囊或注射,用于递送至靶组织部位(例如骨、软骨、肌肉、脂肪或神经元),例如具有组织损伤的部位。局部给药可适用于伤口愈合和组织修复。还可任选包含在上述组合物中的除 ActRIIB 多肽之外的治疗上有用的物质,可作为备选或另外与本发明方法的主题化合物(例如 ActRIIB 多肽)同时或序贯给予。

[0153] 在某些实施方案中,本发明的组合物可包含基质,其能够将一种或多种治疗化合物(例如 ActRIIB 多肽)递送到靶组织部位,为发育组织提供结构,并且最好能够被吸收进体内。例如,基质可提供慢释的 ActRIIB 多肽。这类基质可以形成目前用于其它植入医学应用的材料。

[0154] 基质材料的选择取决于生物相容性、生物降解能力、机械性能、美容外观和界面性质。主题组合物的具体应用将界定适当的制剂。组合物可能的基质可以是生物可降解的和化学上确定的硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸和聚酞。其它可能的材料是生物可降解的和生物学上明确限定的,例如骨或真皮胶原。其它基质由纯的蛋白质或胞外基质组分组成。其它可能的基质是非生物可降解的和化学上确定的,例如烧结羟磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可由任何上述类型的材料的组合组成,例如聚乳酸和羟磷灰石或胶原和磷酸三钙。生物陶瓷可在组成方面改变,例如呈钙-铝酸盐-磷酸盐,并进行加工以改变孔径、颗粒大小、颗粒形状和生物降解能力。

[0155] 在某些实施方案中,本发明的方法可以例如以下形式口服给予:胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基料,一般为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶)、散剂、颗粒剂,或者作为水性液体或非水性液体中的溶液剂或混悬剂、或作为水包油或油包水液体乳剂、或作为酞剂或糖浆剂、或作为软锭剂(使用惰性基料,例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,各自含有预定量的物质作为活性成分。药剂还可作为大丸剂、药糖剂或糊剂给予。

[0156] 在口服给药的固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中,可将一种或多种本发明的治疗化合物与一种或多种药学上可接受的载体混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或以下的任一种:(1) 填充剂或增充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3) 湿润剂,例如甘油;(4) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻滞剂,例如石蜡;(6) 吸收促进剂,例如季铵化合物;(7) 润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;和(10) 着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。在使用诸如乳糖或牛奶糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软充填和硬充填明胶胶囊剂中,相似类型的固体组合物也可用作填充剂。

[0157] 用于口服给药的液体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。除活性成分以外,液体剂型可含有常用于本领域的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具体地说为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可包含辅料,例如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、芳香

剂和防腐剂。

[0158] 除活性化合物以外，混悬剂可含有助悬剂，例如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨糖醇和失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝 (aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和西黄蓍胶及其混合物。

[0159] 本文公开的某些组合物可局部给予至皮肤或黏膜。局部制剂还可包含一种或多种已知有效作为皮肤或角质层的渗透促进剂的多种物质。这些物质的实例为 2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、丙二醇、甲醇或异丙醇、二甲基亚砷和氮酮。另外的物质也可包含在内以使制剂美容上可接受。这些物质的实例为脂类、蜡、油、染料、香料、防腐剂、稳定剂和表面活性剂。角质层分离剂（例如本领域已知的那些）也可包含在内。实例为水杨酸和硫 (sulfur)。

[0160] 局部给药或透皮给药的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。可将活性化合物在无菌条件下与药学上可接受的载体以及与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。所述软膏、糊剂、霜剂和凝胶剂除本发明的主题化合物（例如 ActRIIB 多肽）之外还可包含赋形剂例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、西黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或其混合物。

[0161] 散剂和喷雾剂除主题化合物之外可包含赋形剂例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有常规抛射剂，例如氯氟烃和挥发性未取代的烃，例如丁烷和丙烷。

[0162] 在某些实施方案中，适于胃肠外给予的药物组合物可包含一种或多种 ActRIIB 多肽以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液剂、分散体、混悬剂或乳剂或者无菌粉剂（所述粉剂可在临用前重构成用无菌注射用溶液剂或分散体），其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者血液等渗的溶质或者助悬剂或增稠剂。可用于本发明药物组合物的合适水性载体和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）及其合适的混合物、植物油（例如橄榄油）和注射用有机酯（例如油酸乙酯）。可通过例如使用包衣材料（例如卵磷脂），在分散体的情况下通过保持所需要的粒径，以及通过使用表面活性剂，来保持适当的流动性。

[0163] 本发明的组合物还可含有辅料，例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过加入多种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等，来确保防止微生物的作用。组合物中还可能需要包含等渗剂（例如糖、氯化钠等）。另外，可通过加入延迟吸收的物质（例如单硬脂酸铝和明胶），使可注射药物形式的吸收延长。

[0164] 要理解的是，主治医师在考虑修正本发明的主题化合物（例如 ActRIIB 多肽）的作用的各种因素后，可确定剂量方案。各种因素应视治疗的疾病而定。

[0165] 在某些实施方案中，本发明还提供用于体内产生 ActRIIB 多肽或本文公开的其它化合物的基因疗法。这类疗法可通过将 ActRIIB 多核苷酸序列引入受累于上文所列病症的细胞或组织，来达到其治疗效果。可使用重组表达载体（例如嵌合病毒或胶体分散系统）实现 ActRIIB 多核苷酸序列的递送。优选的 ActRIIB 多核苷酸序列的治疗递送是使用靶向脂质体。

[0166] 可用于本文教导的基因疗法的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、痘苗病毒或优选 RNA 病毒（例如反转录病毒）。优选反转录病毒载体是鼠或禽反转录病毒的衍生

物。可插入单一外源基因的反转录病毒载体的实例包括但不限于：莫洛尼鼠白血病毒 (MoMuLV)、Harvey 鼠肉瘤病毒 (HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒 (MuMTV) 和劳斯肉瘤病毒 (Rous sarcomavirus, RSV)。许多其它的反转录病毒载体可掺入多个基因。所有的这些载体可转移或整合选择标记的基因,使得可鉴定和产生转导细胞。可通过连接例如糖、糖脂或蛋白质,使反转录病毒载体具有靶标特异性。通过使用抗体来完成优选的打靶。本领域的技术人员应认识的是,可将特异性多核苷酸序列插入反转录病毒基因组或与病毒包膜连接,以供含有 ActRIIB 多核苷酸的反转录病毒载体的靶标特异性递送。在一个优选的实施方案中,载体靶定骨、软骨、肌肉或神经元细胞 / 组织。

[0167] 或者,可通过常规磷酸钙转染,将组织培养细胞用编码反转录病毒结构基因 gag、pol 和 env 的质粒直接转染。然后将这些细胞用含有目标基因的载体质粒转染。所得细胞释放反转录病毒载体到培养基中。

[0168] ActRIIB 多核苷酸的另一种靶定递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合体、纳米囊、微球、珠粒和脂质型系统,包括水包油乳液、微团、混合微团和脂质体。优选的本发明的胶体系统是脂质体。脂质体是可体外和体内用作递送载体的人工膜囊泡。RNA、DNA 和完整病毒体可包封在水性内部,并以生物活性形式递送至细胞 (参见例如 Fraley 等, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。使用脂质体载体的有效基因转移方法是本领域已知的,参见例如 Mannino 等, Biotechniques, 6:682, 1988。脂质体的组成一般是磷脂的组合,一般与类固醇 (尤其是胆固醇) 组合。也可以使用其它磷脂或其它脂质。脂质体的物理特性取决于 pH、离子强度和二价阳离子的存在情况。

[0169] 可用于产生脂质体的脂质的实例包括磷脂酰化合物,例如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。说明性的磷脂包括蛋黄磷脂酰胆碱 (egg phosphatidylcholine)、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。根据例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性靶定脂质体也是可行的,并且是本领域已知的。

[0170] 实例

[0171] 现对本发明进行了大致描述,通过参照下列实施例可更容易地理解本发明,包括该实施例仅用于说明本发明的某些实施方案和实施方案的目的,并无意限制本发明。

[0172] 实施例 1. 带有备选核苷酸序列的 ActRIIB(25-131)-hFc 的产生

[0173] 为产生 ActRIIB(25-131)-hFc,将带有 N 端截短和 C 端截短的人 ActRIIB 胞外域 (天然蛋白的残基 25-131) 与 TPA 前导序列在 N 端融合,取代天然的 ActRIIB 前导序列,并与人 Fc 结构域经由最小接头 (三个甘氨酸残基) 在 C 端融合 (图 1)。编码该融合蛋白的核苷酸序列见图 2。申请人修饰密码子并发现编码 ActRIIB(25-131)-hFc 蛋白的变体核酸,其提供最初转化体的表达水平的显著改善 (图 3)。

[0174] 该成熟蛋白具有如下的氨基酸序列 (N 端通过 N 端测序确定) (SEQ ID NO:8) :

[0175] ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

[0176] KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

[0177] TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

[0178] VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

[0179] WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ

[0180] VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

[0181] DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

[0182] 氨基酸 1-107 来源于 ActRIIB。

[0183] 表达分子利用一系列柱层析步骤来纯化,包括例如任何顺序的下列三种或更多种方法:A 蛋白层析法、Q 琼脂糖凝胶层析法、苯基琼脂糖凝胶层析法、大小排阻层析法和阳离子交换层析法。纯化可用病毒过滤和缓冲液更换来完成。

[0184] 实施例 2. ActRIIB(25-131)-hFc 结合的高亲和力配体

[0185] 在体外采用 Biacore™ 仪器评价数种配体对 ActRIIB(25-131)-hFc 及其全长相对物 ActRIIB(20-134)-hFc 的亲和力,并将结果总结于下表中。由于复合体极快的缔合和解离,所以通过稳态亲和力拟合获得 Kd 值,所述极快的缔合和解离阻止 kon 和 koff 的精确测定。ActRIIB(25-131)-hFc 以高亲和力结合激活素 A、激活素 B 和 GDF11。有趣的是,ActRIIB(25-131)-hFc 似乎显示出比 ActRIIB(20-134)-hFc 对 GDF3 更高的亲和力(数据未显示)。

[0186] ActRIIB-hFc 形式的配体亲和力:

[0187]

融合构建体	激活素 A (e-11)	激活素 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

[0188] 实施例 3: ActRIIB(25-131)-hF 在体内增加肌肉质量和肌力

[0189] 本申请人研究了 ActRIIB(25-131)-hFc 增加小鼠的肌肉质量和肌力的能力。将雄性小鼠(n=10 只/组)用溶媒(Tris 缓冲盐水)或 ActRIIB(25-131)-hFc 5 个剂量之一皮下每周治疗两次。如通过全身核磁共振(NMR)扫描所测定,用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 4 周产生瘦组织质量明显的剂量依赖性增加(图 4)。肌肉质量增加在研究终止时对特定肌肉(包括胸肌(图 5)、股直肌和腓肠肌)进行确证。重要的是,如通过握力所评价,与溶媒相比,肌肉质量增加伴随着力量增加(图 6)。这些结果提供令人信服的证据: ActRIIB(25-131)-hFc 在体内增加肌肉质量和肌力两者。

[0190] 实施例 4. ActRIIB(25-131)-hFc 防止雄激素剥夺的小鼠模型中的肌肉丢失

[0191] 本申请人研究了 ActRIIB(25-131)-hFc 防止雄激素剥夺(男性中晚期前列腺癌的标准治疗干预)的小鼠模型中的肌肉丢失的能力。对雄性小鼠(n=10 只/组)进行睾丸切除(ORX)或假手术,并皮下用 TBS 溶媒、10mg/kg 的 ActRIIB(25-131)-hFc 或 10mg/kg 的其全长鼠相对物 ActRIIB(20-134)-mFc 每周治疗两次。瘦组织质量通过全身 NMR 扫描确定。用 ActRIIB-Fc 形式的任一种治疗四周的 ORX 小鼠表现出瘦组织质量自基线的的增加,这与在此期间内在 ORX 对照中观察到的降低相比非常显著(图 7)。在性腺完整条件下与假手术对照相比,对两种 ActRIIB-Fc 形式观察到类似的非常显著的增加(图 7)。这些结果证实,在该雄激素剥夺模型中,ActRIIB(25-131)-hFc 可与其全长相对物 ActRIIB(20-134)-mFc 同样有效地增加瘦组织质量(防止肌肉丢失)。

[0192] 实施例 5. ActRIIB(25-131)-hFc 改善饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中的机体组成

[0193] 本申请人还研究了在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中 ActRIIB(25-131)-hFc 增

加肌肉质量和减少脂肪质量的能力。将雄性小鼠 ($n = 10$ 只 / 组) 喂饲标准食物饮食或高脂饮食, 并腹腔内用 TBS 溶媒或 10mg/kg 的 ActRIIB(25-131)-hFc 每周治疗两次。通过全身 NMR 扫描测定瘦组织质量和脂肪质量。高脂饮食的小鼠用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗四周导致瘦组织质量增加超过 25%, 相比之下溶媒治疗增加 2% (图 8)。与溶媒相比, 在对照饮食的小鼠中用 ActRIIB(25-131)-hFc 得到相似的结果 (图 8)。此外, 发现持续处理改善肥胖。与溶媒相比, 在高脂饮食的小鼠和对照饮食的小鼠中 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗 12 周减少大约一半的脂肪质量 (图 9)。

[0194] 综上, 这些数据证明 ActRIIB(25-131)-hFc 可用于在各种条件 (包括雄激素剥夺和高脂摄入) 下在体内改善机体组成。

[0195] 实施例 6. ActRIIB(25-131)-hFc 使饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中的血清脂质、胰岛素和脂连蛋白正常化

[0196] 本申请人研究了 ActRIIB(25-131)-hFc 在高脂饮食喂饲的雄性小鼠中对临床上重要的脂质、胰岛素、脂连蛋白及其它代谢终点的血清浓度的影响。将十周龄 C57BL/6 小鼠称重配对, 并皮下用 ActRIIB(25-131)-hFc ($n = 10$) 或 Tris 缓冲盐水 (TBS) 溶媒 ($n = 7$) 以 10mg/kg 每周治疗两次, 持续 60 天。在此期间, 小鼠可无限获取含 58% 脂肪的饮食, 代替含 4.5% 脂肪的标准食物。

[0197] ActRIIB(25-131)-hFc 治疗导致一系列显著的代谢作用。在高脂饮食喂饲的小鼠中, ActRIIB(25-131)-hFc 减少病理上升高的甘油三酯、游离脂肪酸、高密度脂蛋白 (HDL) 和低密度脂蛋白 (LDL) 的血清浓度 (图 10-13), 在大多数情况下使这些参数正常至标准饮食喂饲的小鼠中观察到的水平。重要的是, ActRIIB(25-131)-hFc 治疗还使高脂饮食的小鼠中的胰岛素浓度正常化 (图 14) 并使脂连蛋白的浓度明显增加至甚至高于喂食标准饮食的小鼠 (图 15)。脂连蛋白是机体组成的关键生物标记物, 因为已知循环脂连蛋白水平与脂肪质量 / 肥胖症逆向变化, 并且脂连蛋白增强靶组织的胰岛素敏感性。ActRIIB(25-131)-hFc 还减少瘦蛋白的血清浓度接近 50% ($P < 0.05$), 瘦蛋白是肥胖情况的另一种重要指示物。最后, 如通过核磁共振 (NMR) 在基线和第 48 天所测定, 前述作用伴随着机体组成的有益改变。在高脂饮食条件下, 溶媒治疗的对照中的总脂肪质量在该 48 天期间增至 3 倍, ActRIIB(25-131)-hFc 治疗使该增加减少近 40%。至第 48 天, 总脂肪质量在 ActRIIB-Fc 治疗小鼠中占体重的 27%, 与对照小鼠的 39% 成对比, 而瘦组织质量在 ActRIIB(25-131)-Fc 治疗小鼠中占体重的 59%, 与对照小鼠的 55% 成对比。因此, 最终结果是在高脂饮食条件下机体组成更健康。

[0198] 对于前述血清参数, ActRIIB(25-131)-hFc 始终如一地优于 ActRIIB(20-134)-hFc, 也在该相同的研究中评价了 ActRIIB(20-134)-hFc。因此, ActRIIB(25-131)-hFc 对甘油三酯水平的改善为同一剂量的 ActRIIB(20-134)-hFc 的接近 6 倍, 对 FFA 水平的改善为其接近两倍, 对 HDL 水平的改善为其接近 4 倍, 对胰岛素水平的改善为其两倍还多, 和对脂连蛋白水平的改善为其接近 1.5 倍。

[0199] 实施例 7: ActRIIB(25-131)-hFc 诱导饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中白色脂肪的产热性质

[0200] 在上述研究 (实施例 6) 中, 本申请人还研究了 ActRIIB(25-131)-hFc 对白色脂肪组织的产热性质的影响。在高脂饮食条件下, ActRIIB(25-131)-hFc 治疗引发白色脂肪组织

的组织学改变和基因表达谱,其与产热能力一致。如图 16 所示,附睾白色脂肪组织学检查表明 ActRIIB(25-131)-hFc 减少脂滴大小并导致多房脂肪细胞簇(其为褐色脂肪的特点)的形成。此外,该组织的免疫组化分析显示作为 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗的结果,在多房脂肪细胞和单房脂肪细胞两者中 UCP1 的广泛胞质诱导(图 16)。

[0201] 通过定量 RT-PCR(反转录聚合酶链式反应)测定,伴随着这些组织学变化的是附睾白色脂肪中关键的产热和代谢调节基因表达的显著变化。在高脂饮食的小鼠中,ActRIIB(25-131)-hFc 治疗增加 UCP1 的 mRNA 水平至溶媒的 60 倍还多(图 17),这是非常令人印象深刻的变化,因为相比其它小鼠品系,小鼠的该品系表现出关键白色脂肪库内的 UCP1 和褐色脂肪细胞严重钝化的诱导(Guerra 等,1998, *J Clin Invest* 102:412-420; Xue 等,2007, *J Lipid Res* 48:41-51)。此外,ActRIIB(25-131)-hFc 治疗增加编码沉默调节蛋白 SIRT-1(沉默信息调节剂 2,同源物 1)的 mRNA 水平,沉默调节蛋白 SIRT-1 是能量敏感型主要调节剂(脱乙酰基酶),其针对高脂饮食诱导的代谢损伤提供保护(Pfluger 等,2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9793-9798)并表明为脂肪酸动员的重要控制物(Rodgers 等,2008, *FEBS Lett* 582:46-53)。重要的是,ActRIIB(25-131)-hFc 治疗还增加编码 PGC-1 α (过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活物-1 α)的 mRNA 水平,PGC-1 α 是 SIRT-1 的充分证明的靶标,其进而控制褐色脂肪组织中线粒体生物合成和产热能力所必需的很多基因的表达(Uldry 等,2006, *Cell Metab*, 3:333-341)。值得注意的是,已显示 PGC-1 α 在白色脂肪细胞中的强迫表达诱导包括 UCP1 在内的基因表达的产热程序,其与褐色脂肪细胞中的紧密类似(Hansen 等,2006, *Biochem J* 398:153-168)。在本研究中,高脂饮食条件下,ActRIIB(25-131)-hFc 恢复白色脂肪组织的 PGC-1 α 基因表达达到与喂食标准饮食的小鼠中的那些不可区别的水平。

[0202] 与治疗相关的另外的变化构成白色脂肪组织中表达谱改变和有益激素和代谢作用之间的突出联系。因此,在附睾白色脂肪中,ActRIIB(25-131)-hFc 增加编码 Foxo-1(含叉头框的蛋白质 0 亚族-1)的 mRNA 水平,Foxo-1 是既是 SIRT-1 的靶标又是脂连蛋白表达的关键诱导物的转录因子(Qiao 等,2006, *J Biol Chem* 281:39915-39924)。与 Foxo-1 mRNA 的诱导一致,ActRIIB(25-131)-hFc 治疗升高白色脂肪中脂连蛋白 mRNA 的水平(图 18),这有助于说明在这些动物中脂连蛋白的循环水平增加(图 15,实施例 6),靶组织的胰岛素敏感性增强和正常化的胰岛素浓度(图 14,实施例 6)。总而言之,高脂饮食条件下的 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗导致 1) 与产热能力一致的白色脂肪组织中的组织学变化和基因表达谱和 2) 大范围的激素参数和代谢参数的有益改变。

[0203] 实施例 8. ActRIIB(25-131)-hFc 在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对肝和肌肉的作用

[0204] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是越来越常见的肝病,被广泛认为是代谢综合征的肝脏表现,并且特征在于肝脏中的脂肪积聚(脂肪变性),往往具有有害作用。一个 NAFLD 患者亚类发展成被称为非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的炎性病况,它可进一步发展为肝纤维化、肝硬化、肝细胞癌(Perlemuter 等,2007, *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:458-469)。在上述研究(实施例 6-7)中,本申请人研究了 ActRIIB(25-131)-hFc 能否抑制与高脂饮食相关的肝脂肪变性。研究完成时,通过 Oil Red O 染色评价,喂饲高脂饮食的小鼠的肝组织显示大量密集的脂滴,而喂食标准饮食的小鼠没有表现出明显的肝脂质沉积

(图 19)。尽管高脂饮食,但用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗几乎完全逆转肝脂质沉积,并使肝组织的外观正常化。因此,ActRIIB(25-131)-hFc 是高脂饮食导致的肝脂肪变性的有效抑制剂。

[0205] ActRIIB(25-131)-hFc 治疗还在这种饮食诱发的肥胖症的模型中增加肌肉质量,与其它模型中的发现一致(实施例 3-5)。具体而言,相对于高脂饮食对照 ActRIIB(25-131)-hFc 增加胸肌质量超过 70 % ($P < 0.001$),增加腓肠肌质量近 40 % ($P < 0.001$),和增加股直肌质量超过 25 % ($P < 0.001$)。如通过 RT-PCR 在腓肠肌组织中所确定,肌肉质量的这些变化伴随着肌肉基因表达的变化。相对于高脂饮食对照,ActRIIB(25-131)-hFc 增加腓肠肌中 PGC-1 α mRNA 水平和 Foxo-1 mRNA 水平各约 50 % ($P < 0.05$)。

[0206] 实施例 9. ActRIIB(25-131)-mFc 在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对内脏白色脂肪的作用

[0207] 内脏脂肪的积聚,与皮下脂肪相反,在心血管疾病和肥胖症相关病症例如糖尿病、高血脂、高血压和代谢综合征的发展中起关键作用(Matsuzawa 等, 2006, FEBS Lett 580:2917-2921)。由于它的位置,内脏(或腹内)脂肪已准备好通过肝门循环进入肝脏,在此其可影响代谢,促进胰岛素抵抗并导致脂肪变性。因此,在与上述研究(实施例 6-8)类似的研究中,本申请人研究了在高脂饮食条件下截短变体 ActRIIB(25-131)-mFc 对内脏脂肪的量对比腹部皮下脂肪的量的作用。将九周龄 C57BL/6 小鼠用 10mg/kg 的 ActRIIB(25-131)-mFc ($n = 20$) 或 Tris 缓冲盐水(TBS)溶媒($n = 10$)经皮下治疗,每周两次,持续 60 天。给药开始前 7 天开始,小鼠可无限获得含 58%脂肪的饮食,替代含 4.5%脂肪的标准食物。保持标准食物饮食的另一组小鼠($n = 10$)也用 TBS 溶媒治疗并随后作为饮食对照。对小鼠的亚群($n = 4$ 只/组)通过显微 CT 测定脂肪体积,通过核磁共振(NMR)分析测定的该小鼠全身脂肪的百分比最接近组平均值(所有小鼠接受核磁共振分析)。

[0208] 内脏脂肪和腹部皮下脂肪两者均随着饮食和 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗显著变化。研究中途(35 天)得到的显微 CT 图像的三维重构证实,内脏脂肪库和皮下脂肪库两者均作为高脂饮食的结果而扩大,并且 ActRIIB(25-131)-mFc 在很大程度上逆转那些增加(图 20)。当在研究终结(60 天)时定量分析时,与仅高脂饮食相比,ActRIIB(25-131)-mFc 对内脏脂肪(图 21)和腹部皮下脂肪(图 22)两者的作用是非常显著的。

[0209] 实施例 10. ActRIIB(25-131)-mFc 在饮食诱发的肥胖症的小鼠模型中对褐色脂肪性质的影响

[0210] 在实施例 9 中所述的研究中,本申请人还研究了 ActRIIB(25-131)-mFc 对高脂饮食条件下肩胛间褐色脂肪库的性质的影响。相对于标准饮食,高脂饮食在肩胛间褐色脂肪组织库中产生若干变化,而 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗完全或很大程度上逆转每一种这些变化。具体而言,高脂饮食导致肩胛间库的明显扩大并使其颜色从红色至粉红变浅(图 23)。该饮食诱导的扩大反映棕色脂肪库的质量的翻倍(图 24)和密度的减少(图 25)。通过显微计算机断层扫描术(显微 CT)在原位测定小鼠亚群($n = 4$ 只/组)的库密度,通过核磁共振(NMR)分析测定的该小鼠总全身脂肪的百分比最接近组平均值(所有小鼠接受核磁共振分析)。ActRIIB(25-131)-mFc 治疗完全逆转饮食诱发的褐色脂肪质量(图 24)和密度(图 25)的变化,同时很大程度上逆转饮食诱发的库的大小和颜色的变化(图 23)。

这些结果表明,在高脂饮食条件下,ActRIIB(25-131)-mFc 很大程度上或完全地恢复可能与健康的褐色脂肪功能相关的性质,因而随着它减少褐色脂肪库的总体大小,改善褐色脂肪的质量。

[0211] 实施例 11. ActRIIB(25-131)-mFc 对衰老小鼠模型中肌肉、骨、脂肪和代谢激素的影响

[0212] 身体组成随衰老以可预测的方式变化。肌肉质量和肌力的正常的年龄依赖型下降,被称作肌肉衰减综合征,从约 30 岁开始并在 60 岁之后加速 (Stenholm 等, 2008, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 11:693-700)。骨质量和骨强度,表现出相似的随年龄下降,导致老年人中骨质疏松症的风险增加。全身脂肪质量随着年龄而增加直至约 70 岁,然后绝对项下降但保持全身质量的大致恒定比例 (Cartwright 等, 2007, Exp Gerontol 42:463-471)。基于其它模型观察和本文所述的功效,本申请人研究了 ActRIIB(25-131)-mFc 对衰老小鼠模型中肌肉、骨、脂肪和胰岛素水平的影响。19 个月大的雄性 C57BL/6 小鼠给予无限制的标准食物饮食,并用 10mg/kg 的 ActRIIB(25-131)-mFc ($n = 16$) 或 Tris 溶媒 ($n = 15$) 经皮下治疗,每周两次,持续 8 周。作为参照系,之前发现在标准饮食条件下该小鼠品系的中位寿命预期为约 27 个月 (Turturro 等, 2002, J Gerontol ABiol Sci Med Sci 57:B379-389)。

[0213] ActRIIB(25-131)-mFc 治疗在这些衰老小鼠中产生身体组成和代谢激素作用的一系列显著变化。通过全身 NMR 分析测定,研究过程期间瘦组织质量在对照小鼠中基本上保持不变,而在 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗的小鼠中至 7 周时其逐步增加至几乎高于基线 20% (图 26)。与该全身作用一致,在 8 周时与溶媒治疗对照相比,ActRIIB(25-131)-mFc 还显著增加各肌肉群的质量,包括:胸肌 (增加 55%)、股直肌 (40%)、三头肌 (40%) 和腓肠肌 28%)。重要的是,ActRIIB(25-131)-mFc 治疗改善神经肌肉功能,如通过依照已确立的方案的前肢握力测试所确定 (http://jaxservices.jax.org/phenotyping/gripstrength_protocol.html) (图 27)。

[0214] 在衰老小鼠中 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗改善若干骨相关参数。通过 DEXA 分析在基线和 8 周的时间点测定,ActRIIB(25-131)-mFc 在研究期间增加全身骨矿物质密度,而对照组基本保持不变 (图 28)。另外,胫骨近端的显微 CT 分析表明 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗 8 周使胫骨近端的骨体积分数与对照组相比翻了一倍 ($P < 0.01$)。

[0215] ActRIIB(25-131)-mFc 对衰老小鼠的脂肪产生重大影响。通过 NMR 分析在多个时间点测定,在研究期间溶媒治疗的对照中全身脂肪质量逐渐下降 (图 29),与老年人中的发现一致。ActRIIB(25-131)-mFc 治疗加速这一变化,引起为对照中观察到的两倍幅度的减少 (分别为 -44% 对比 -19%) (图 29)。至终时间点,ActRIIB(25-131)-mFc 显著降低个体附睾、腹股沟和腹膜后的白色脂肪库的质量 48-54%。有趣的是,ActRIIB(25-131)-mFc 治疗还减少肩胛间褐色脂肪库的质量近 45% ($P < 0.05$),与饮食肥胖症的小鼠模型中对该组织得到的结果相似 (实施例 10)。最后,通过在来自各个组别的代表性小鼠亚组 ($n = 4$) 中的显微 CT 分析所测定,ActRIIB(25-131)-mFc 减少 65% 腹部脂肪的内脏组分的体积 ($P < 0.01$) 和 49% 腹部脂肪的皮下组分的体积 ($P < 0.01$)。因此,在该衰老模型中 ActRIIB(25-131)-mFc 强烈靶向关键的内脏脂肪区室。

[0216] ActRIIB(25-131)-mFc 还对衰老小鼠中重要的代谢激素产生有益的变化。用

ActRIIB(25-131)-mFc 治疗八周使循环脂连蛋白浓度几乎翻倍 ($P < 0.01$) 并降低循环胰岛素浓度超过 40% (图 30)。升高的空腹胰岛素浓度 (高胰岛素血症) 是广泛认可的胰岛素抵抗的替代衡量 (Weyer 等, 2000, Diabetes 49:2094-2101), 并且在目前的研究中增加的脂连蛋白浓度很可能有助于改善胰岛素敏感性。在该研究中, 糖化血红蛋白 (A1C) 浓度显著被 ActRIIB(25-131)-mFc 所减少 (图 31), 从而为在该衰老模型中用 ActRIIB(25-131)-mFc 治疗改善葡萄糖调节提供额外的证据。

[0217] 实施例 12. ActRIIB(25-131)-hFc 在癌症恶病质的小鼠模型中对瘦组织的影响

[0218] 恶病质是因肌肉和脂肪组织丢失所致的非所需的体重减轻。许多肿瘤与食欲不振和严重的肌肉丢失相关, 并且表现出恶病质的患者比非恶病质患者预后差。由于结肠癌细胞系 CT26 在小鼠中诱导严重的恶病质, 所以 ActRIIB(25-131)-hFc 在该小鼠模型中检测对异种移植诱发的恶病质的潜在影响。八周龄 BALB/c 小鼠皮下注射 106 个结肠-26 腺癌 (CT26) 细胞 / 小鼠。肿瘤植入两周后, 治疗如下开始: 皮下注射 10mg/kg 的 ActRIIB(25-131)-hFc ($n = 15$) 或 Tris 缓冲盐水 (TBS) 溶媒 ($n = 13$), 每周两次。BALB/c 小鼠的其它组不接受 CT26 细胞但用如上的 ActRIIB(25-131)-hFc 或溶媒治疗。ActRIIB(25-131)-hFc 治疗导致体重显著增加, 这在研究期间得以保持。肿瘤植入后 5 周, 通过 NMR 分析测定, 溶媒治疗的小鼠表现出瘦组织质量自基线的 7% 丢失, 而用 ActRIIB(25-131)-hFc 治疗的小鼠表现出瘦质量自基线的 27% 增加 (图 32)。脂肪质量在组间差异不显著。这些结果证实 ActRIIB(25-131)-hFc 可缓解荷瘤小鼠的恶病质并可作为用于治疗癌症患者中的恶病质的有效治疗。

[0219] 综上, 这些数据表明 ActRIIB(25-131)-hFc 融合蛋白可用作 TGF 家族配体的信号转导的拮抗剂, 以逆转与饮食诱发的肥胖症相关的许多病理代谢改变, 从而治疗由高热量摄入加剧的代谢病况。此外, ActRIIB(25-131)-hFc 可用于治疗与衰老或癌症恶病质相关的病理代谢变化。

[0220] 通过引用结合

[0221] 本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体结合到本文中, 就像每个独立出版物或专利具体而单独指明通过引用结合一样。

[0222] 虽然论述了主题的具体实施方案, 但上述说明书是说明性的而非限制性的。当回顾本说明书和随附权利要求书时, 许多变动对本领域技术人员而言将变得显而易见。应参考权利要求书及其等同内容的整个范围和说明书及这类变化来确定本发明的整个范围。

[0001]

<110> 阿塞勒隆制药公司

<120> 截短的ACTRIIB-FC融合蛋白

<130> PHPH-045-W01

<140> PCT/US2010/037787

<141> 2010-06-08

<150> 61/280, 543

<151> 2009-11-03

<150> 61/268, 420

<151> 2009-06-12

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 1

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
1 5 10 15

Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn

[0002]

85							90					95					
Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg		
100							105					110					
Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro		
115							120					125					
Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu		
130							135					140					
Pro	Ile	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Trp	Met	Tyr		
145							150					155					160
Arg	His	Arg	Lys	Pro	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Asp	Ile	His	Glu	Asp	Pro		
165							170					175					
Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu		
180							185					190					
Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Gly	Cys	Val	Trp	Lys	Ala	Gln		
195							200					205					
Leu	Met	Asn	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Leu	Gln	Asp	Lys		
210							215					220					
Gln	Ser	Trp	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Pro	Gly	Met	Lys		
225							230					235					240
His	Glu	Asn	Leu	Leu	Gln	Phe	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Ser	Asn		
245							250					255					
Leu	Glu	Val	Glu	Leu	Trp	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Lys	Gly	Ser		
260							265					270					
Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Trp	Asn	Glu	Leu	Cys		
275							280					285					

[0003]

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu

[0004]

485	490	495
Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile		
500	505	510
 <210> 2		
<211> 1539		
<212> DNA		
<213> 人类		
 <400> 2		
atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgtgtggcc cggctctggg		60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc		120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggt gcactgctac		180
gcctctctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggtg ctggctagat		240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacc ccaggtgtac		300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgttca ctcatttgcc agaggtggg		360
ggcccgaag tcacgtacga gccaccccg acagcccca cctgtctac ggtgtctggc		420
tactcactgc tgcccatcgg ggccctttcc ctcatctcc tgcctggcctt ttggatgtac		480
cggcatcgca agcccccta cggtcattgt gacatccatg aggaccctgg gcctccacca		540
ccatccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgtctg agatcaaggc tcgggggcgc		600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca		660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag		720
cacgagaacc tgctacagtt cattgtctgc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag		780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac		840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacagg cctctcatac		900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg		960
gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt		1020
ggcttggtg ttcgatttga gccagggaac cctccagggg acaccacagg acaggtaggc		1080
acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc		1140

[0005]

```

ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc      1200
aaggetgcag acggacccgt ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag      1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt      1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc      1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgctc ggggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg      1440
attcggaggt cggtaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc      1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa                                1539

```

<210> 3

<211> 360

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 3

```

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 Gly Ala Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
              20              25              30

```

```

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
35              40              45

```

```

Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
50              55              60

```

```

Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu
65              70              75              80

```

```

Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu
85              90              95

```

```

Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu

```

[0006]

100	105	110
Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu 115	120	125
Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala 130	135	140
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro 145	150	155 160
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val 165	170	175
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val 180	185	190
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln 195	200	205
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln 210	215	220
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala 225	230	235 240
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro 245	250	255
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr 260	265	270
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser 275	280	285
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 290	295	300

[0007]

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 4

<211> 1083

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (73).. (396)

<400> 4

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg cc gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg 111

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp

1 5 10

gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag 159

Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu

15 20 25

cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc 207

Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly

30 35 40 45

acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc 255

Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys

50 55 60

tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac 303

[0008]

Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr	
65 70 75	
ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg	351
Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu	
80 85 90	
cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca	396
Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr	
95 100 105	
ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	456
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	516
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	696
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	756
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc	816
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagca catcgccgtg	876
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	936
tccgacggt ctttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	996
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag	1056
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1083

<210> 5

<211> 1083

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 5

tcatttaccc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaggctcatg 60

catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgcca cggtagctt 120

[0009]

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggctgtgtct ttagtttgtt	180
ctccggctgc ccattgtctt cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac	240
caggcaggtc aggtgacct ggttcttggt catctcctcc cgggatgggg gcagggtgta	300
cacctgtggt tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg	360
gagggttttg ttggagacct tgcaacttgta ctccttgcca ttcagccagt cctggtgcag	420
gacggtgagg acgtgacca cacggtacgt gctgttgtag tgctcctccc gcggctttgt	480
cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc	540
gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgtc	600
cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cgggtccccc aggagttcag gtgctgggca	660
cgggtggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacgtga cttccgggcc	720
cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgtc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa	780
gtacacctgg gggttctcct cagtggccac acactcctgc ctatcgtagc agttgaagtc	840
atctagccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggaggc	900
gtagcagtgc agccgcttgt cctgtctgcc ttgcagcgc tccaggccgc tctggttggt	960
gcgctccagc tcccagttgg cgttgtagta gatgcactcc cgtgtctcag cggcgccggg	1020
cgaaacgaag actgtccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcac	1080
cat	1083

<210> 6

<211> 1083

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (73).. (396)

<400> 6

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

[0010]

tcgccccggcg cc gcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp 1 5 10	111
gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu 15 20 25	159
cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly 30 35 40 45	207
acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg ctg gac gat ttc aat tgt Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys 50 55 60	255
tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr 65 70 75	303
ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu 80 85 90	351
ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr 95 100 105	396
ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	456
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	516
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	696
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc	756
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc	816
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgtgc aaaggtttct atcccagcga catgccgtg	876
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	936
tccgacggct cctttctcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	996
gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cagcagaag	1056

[0011]

agcctctccc tgtccccggg taaatga	1083
<210> 7	
<211> 1083	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸	
<400> 7	
tcatittaccc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaggcctcatg	60
catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtgagctt	120
gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggctgtgtct ttagttgtt	180
ctccggctgc ccattgtctt cccactccac ggcatgtcg ctgggataga agcctttgac	240
caggcaggtc aggtgacct ggttcttggc catctctcc cgggatgggg gcagggtgta	300
cacctgttgt tctcggggct gccctttggc ttgggatg gttttctga tgggggctgg	360
gagggccttg ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca ttcagccagt cctggtgcag	420
gacggtgagg acgtgacca cacggtacgt gctgtgttac tgctctccc gcggctttgt	480
cttggcatta tgcacctcca cggcgccac gtaccagtg aactgacct cagggtcttc	540
gtggctcacg tccaccacca cgcattgac ctccagggtc cgggagatca tgagggtgac	600
cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cgggtccccc aggagttcag gtgctgggca	660
cgggtggcat gtgtgagttc caccaccggt gggcgggggt tcataggtca cctcggggcc	720
gccggcttcg gggaggtggg taaaccgtt attacagaaa ttcccctgc aacaacagaa	780
atagacctgc ggattctctt cggctcgcac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc	840
gtccagccag caccctttct tgaccagttc aatcgtcccg gaggagttcc tccacgacgc	900
atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctacaccgt tcgagcccgg attggttcgt	960
ccgttcgagt tcccaattag cattgtaata aatacatcgc cgggtttcgg cggcgccggg	1020
cgaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcac	1080
cat	1083

[0012]

<210> 8
<211> 335
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 8
Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15
Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His
100 105 110
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
130 135 140
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
145 150 155 160

[0013]

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
210 215 220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
225 230 235 240

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
245 250 255

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
260 265 270

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330 335

<210> 9

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<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> 9

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

[0015]

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> 10
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 10
 tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgcca ctgggagctg 60
 gagegcacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcgctgcac 120
 tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggtctgtg 180
 ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccactgagga gaacccccag 240
 gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gtttactca ttgccagag 300
 gctgggggcc cggaagtcac gtacgagcca ccccgacag ccccccacc 348

<210> 11

[0016]

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 11
Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 12
Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成6xHis标签

<400> 13
His His His His His His
1 5

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 14
Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu
1 5 10 15

[0017]

Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys
20 25 30

Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu
35 40 45

Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg
50 55 60

Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys
65 70 75 80

Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala
85 90 95

Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 15

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu
1 5 10 15

Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys
20 25 30

Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu
35 40 45

Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg
50 55 60

[0018]

Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys
65					70				75					80	

Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala
			85					90						95	

Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr
		100					105				

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPOV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

图 1

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

           A E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

           N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGCGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

           E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGGCAACAG
   CTTCCGCTCG TCCTGTTTCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

           S G T I E L V K K G C W L D D F
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
   GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAAGT

           N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

           Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

           P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTTCAGTGCAT GTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAAC TCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC CTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCTTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCA TGG CACACCAGTC

651 CGTCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
   TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

```

图 2

```
801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 4)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 5)
```

图2(续)

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                                     A E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCGAAAC CCGGAATGT ATTTATTACA
   TCAGAAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
   TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
   CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

S G T I E L V K K G C W L D D F
201 CTCGGGACG ATGGAACCTG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GAGGATTTCA
   GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
   TAACAATACT GGCGTCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
   ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

P E A G G P E V T Y E P P P T
351 CCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACCGGTG
   GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCC CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCTGGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

```

图 3

```

751   AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTGTA TGTCTTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 6)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 7)

```

图 3(续)

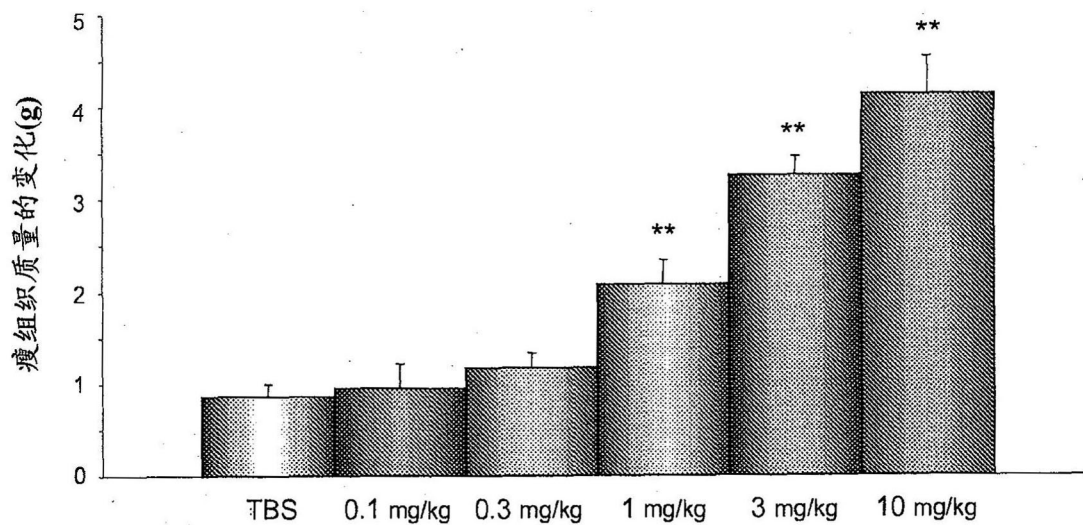


图 4

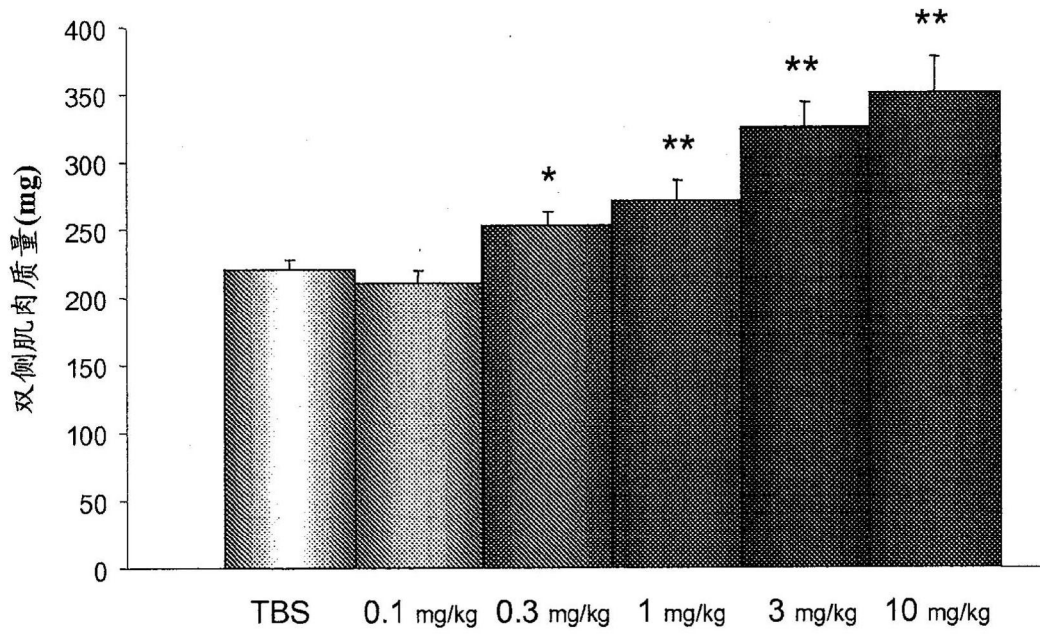


图 5

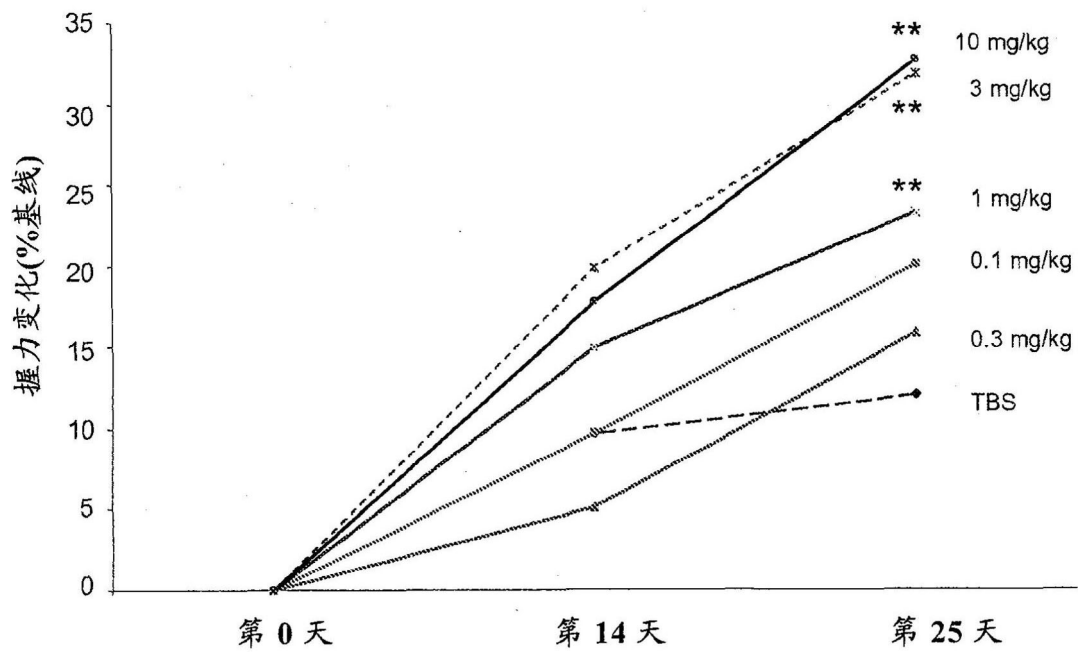


图 6

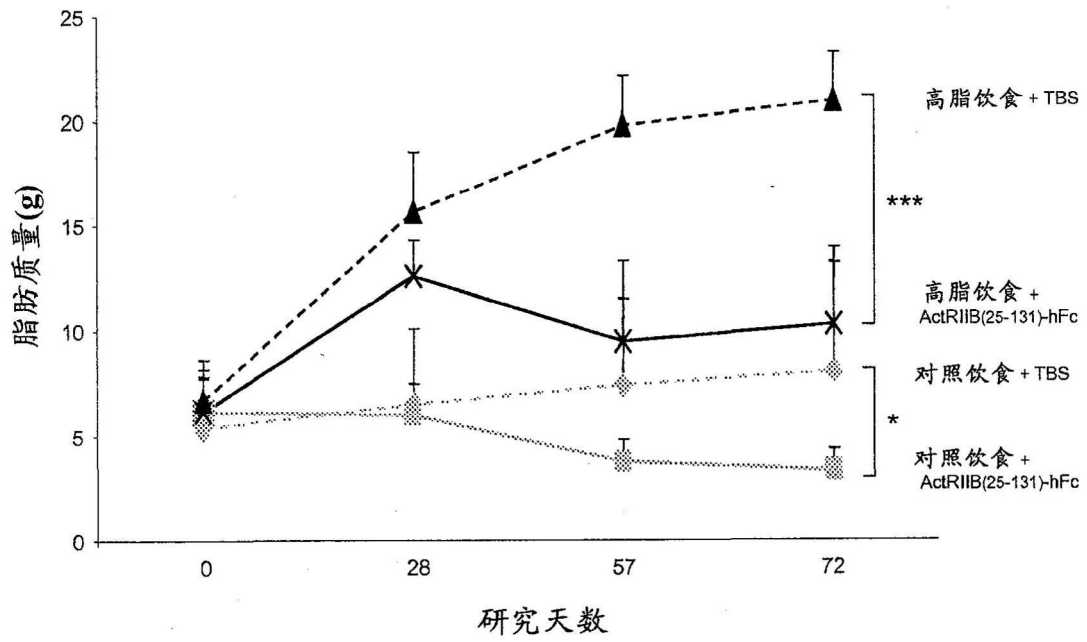


图 9

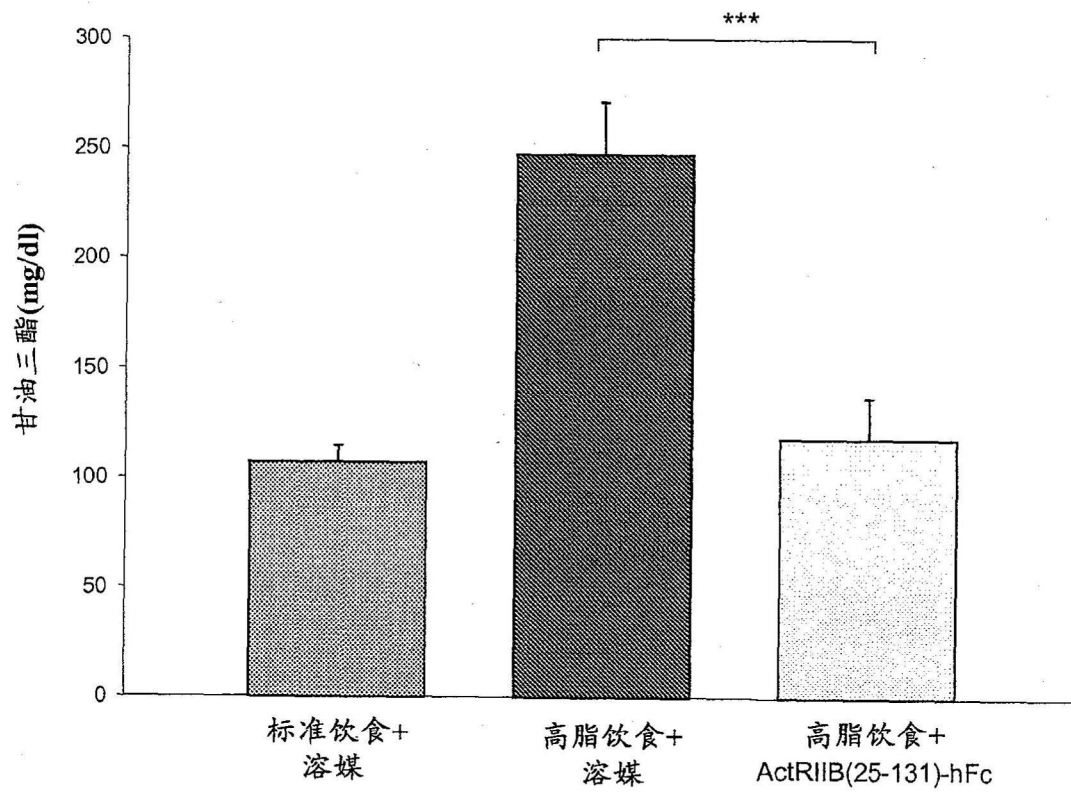


图 10

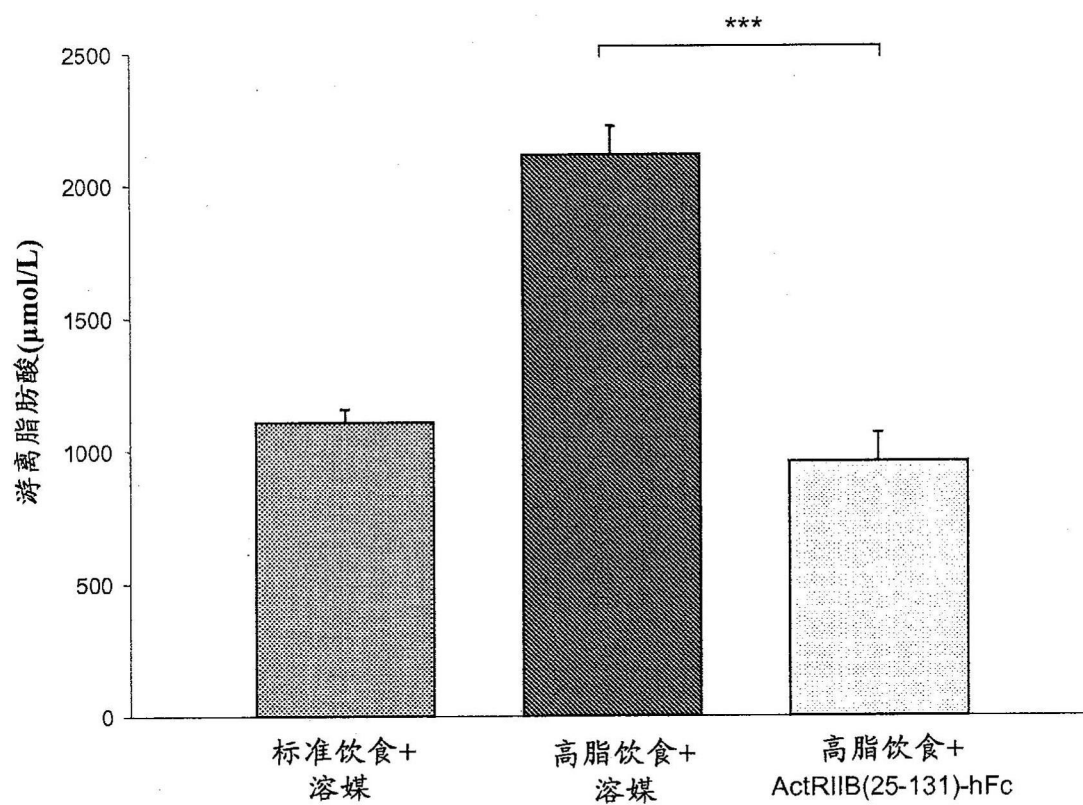


图 11

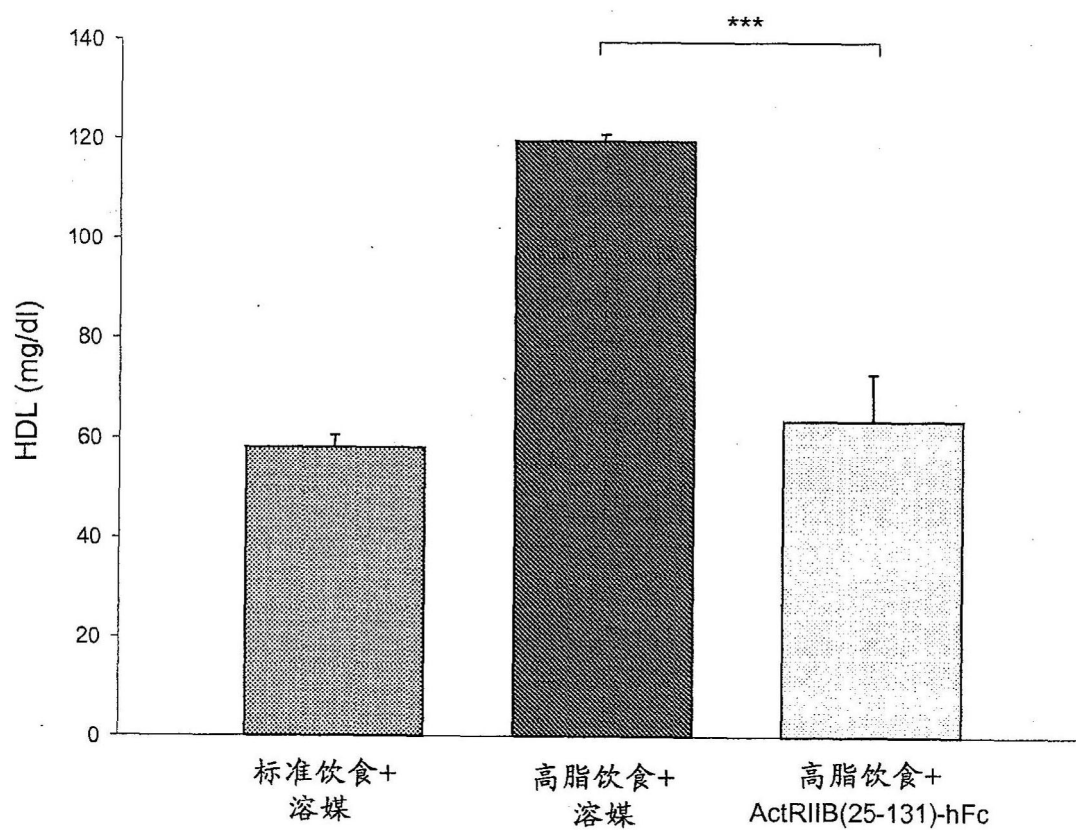


图 12

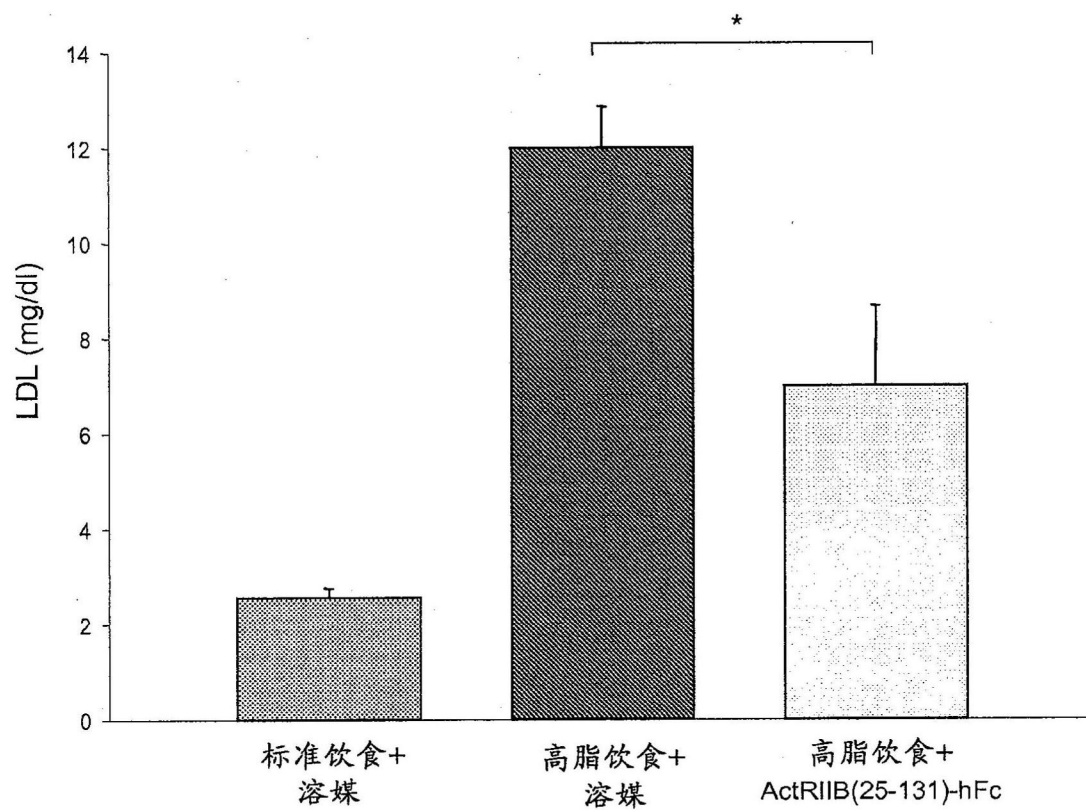


图 13

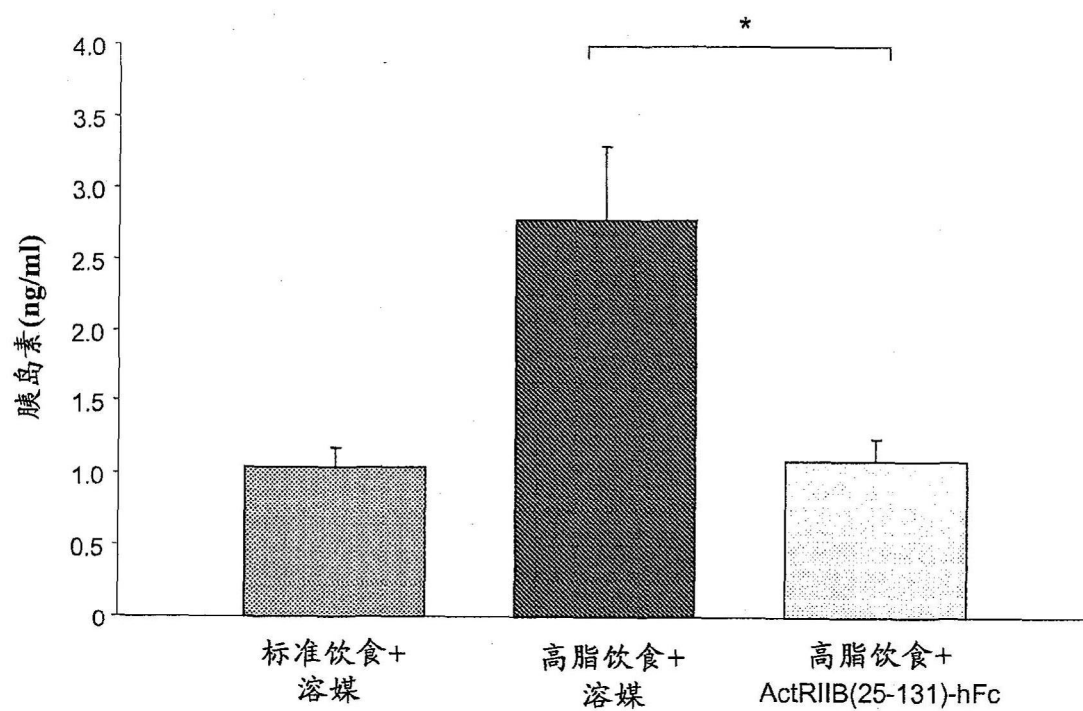


图 14

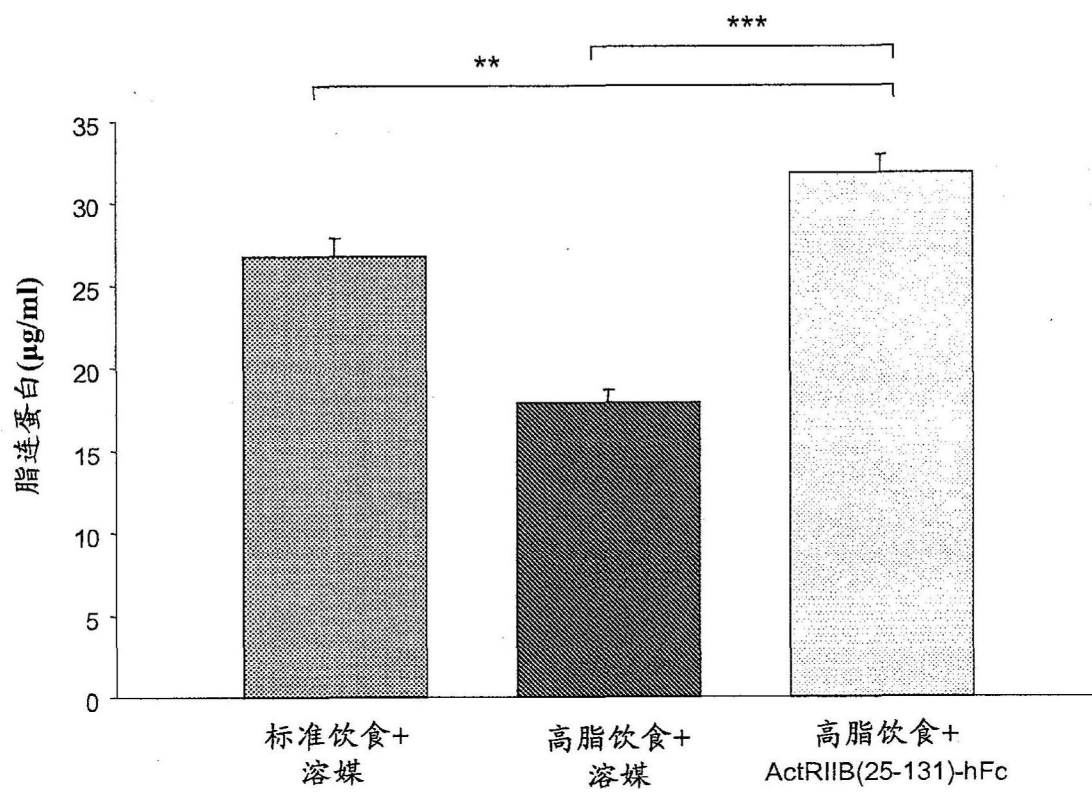


图 15

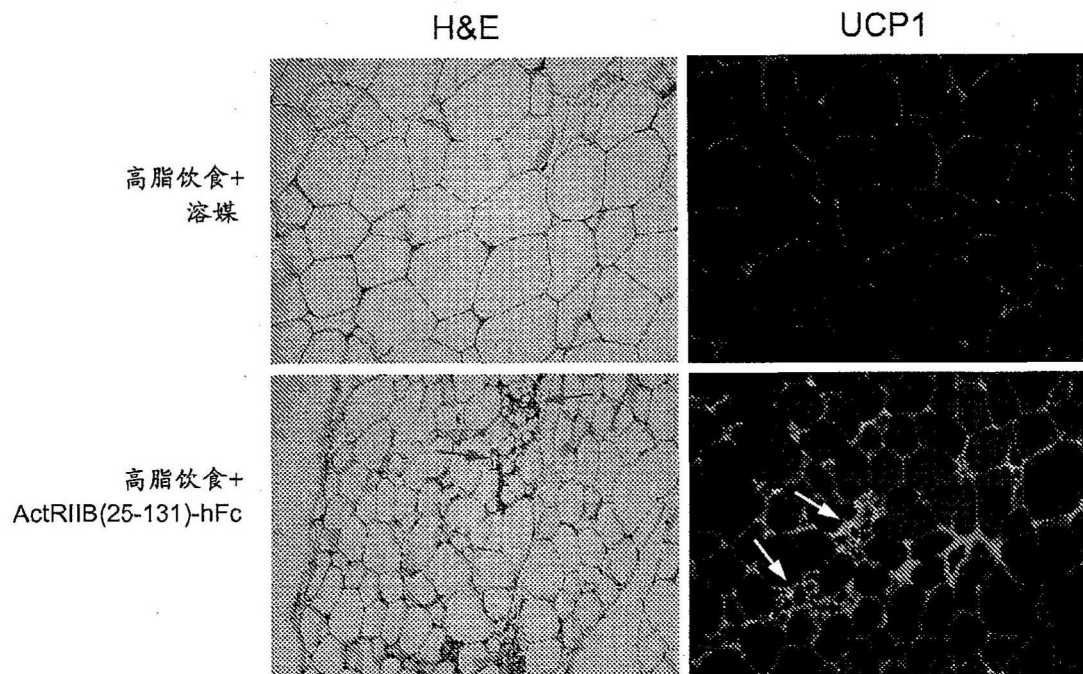


图 16

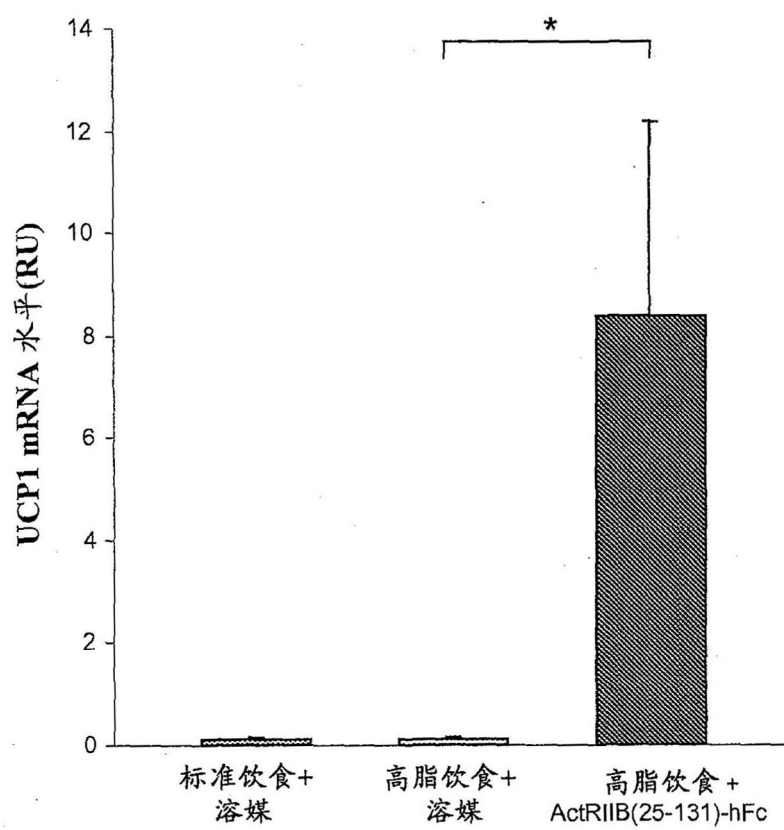


图 17

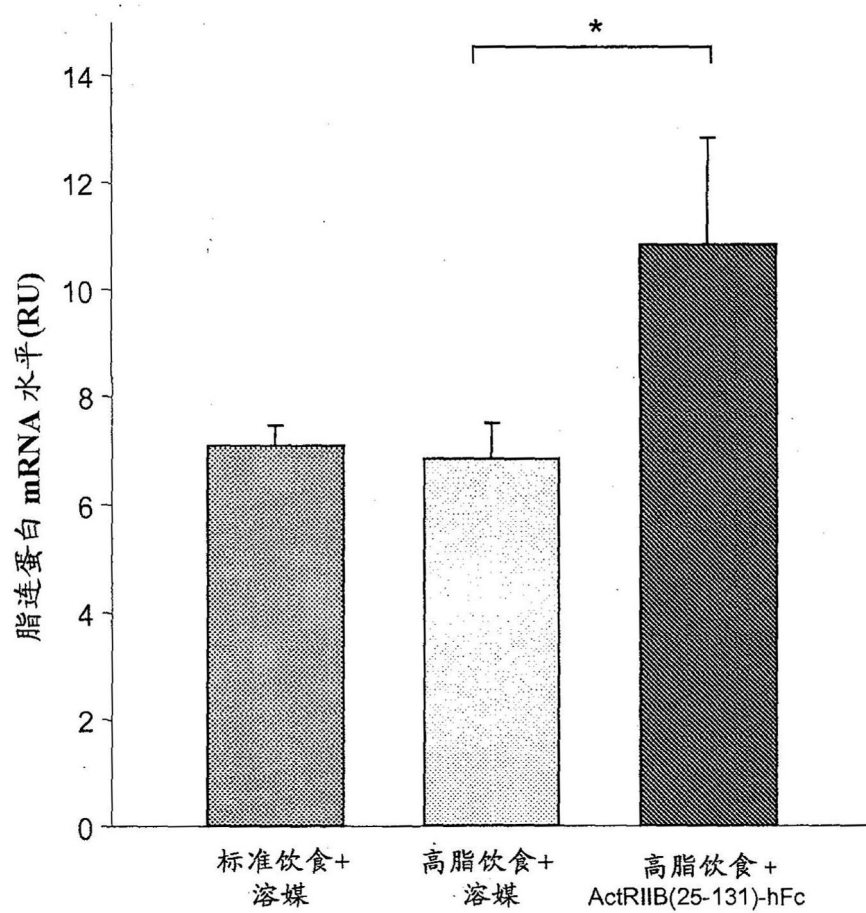


图 18

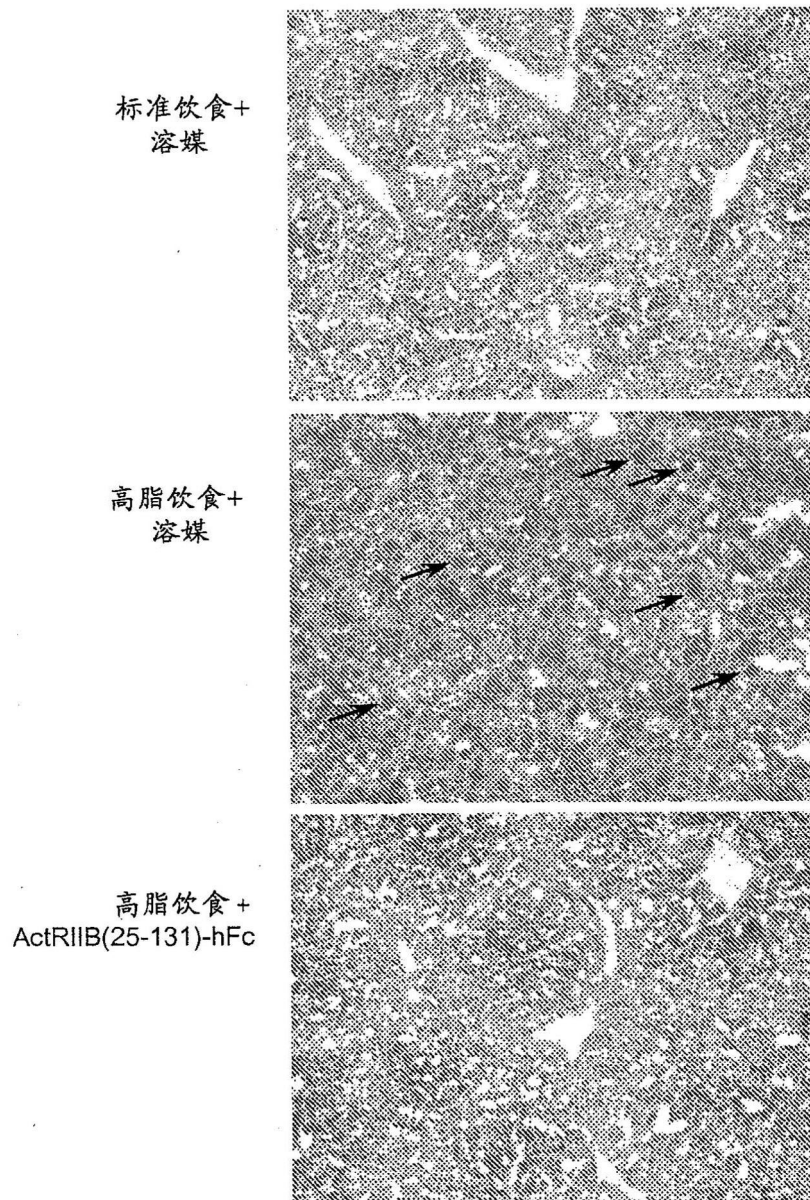


图 19

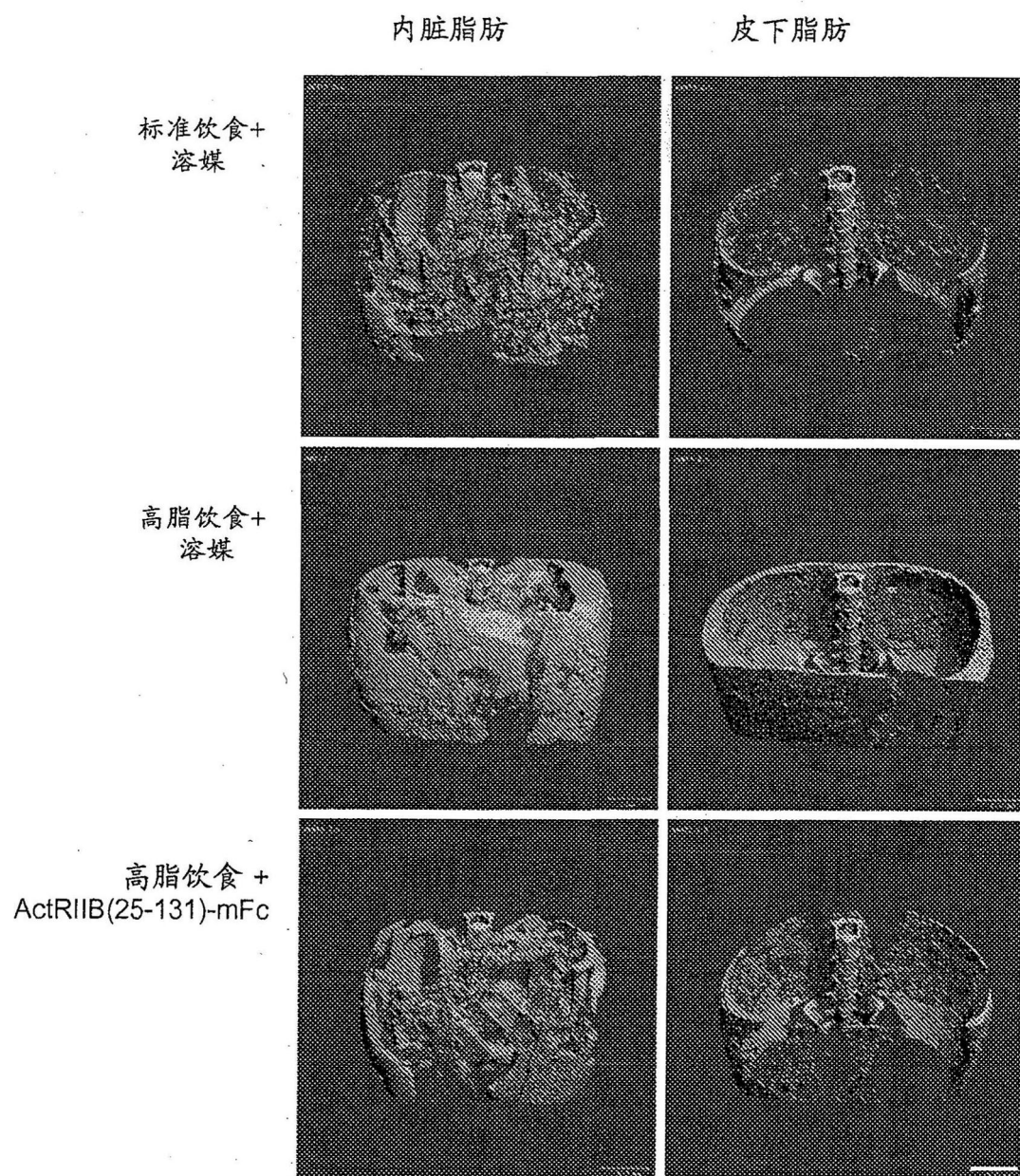


图 20

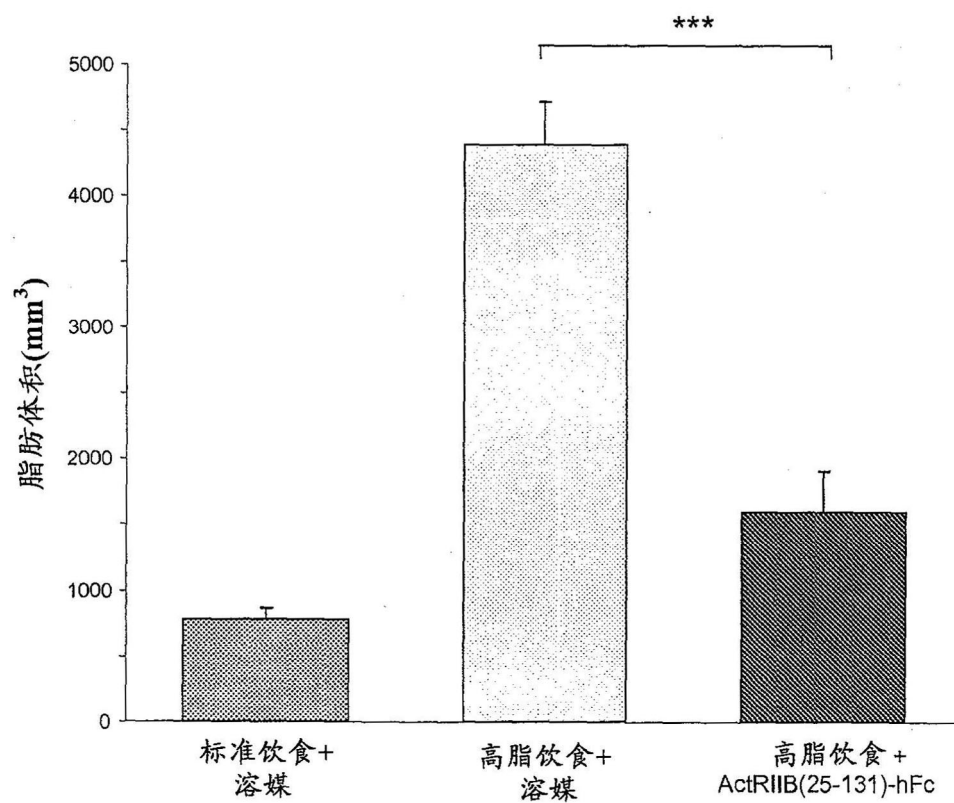


图 21

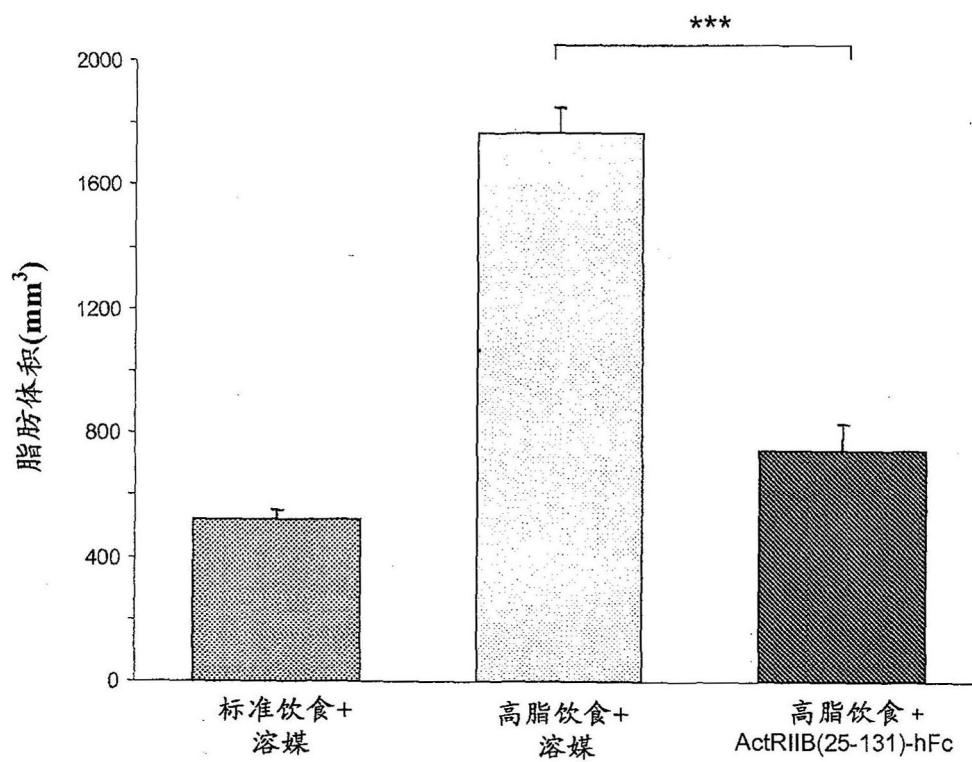


图 22

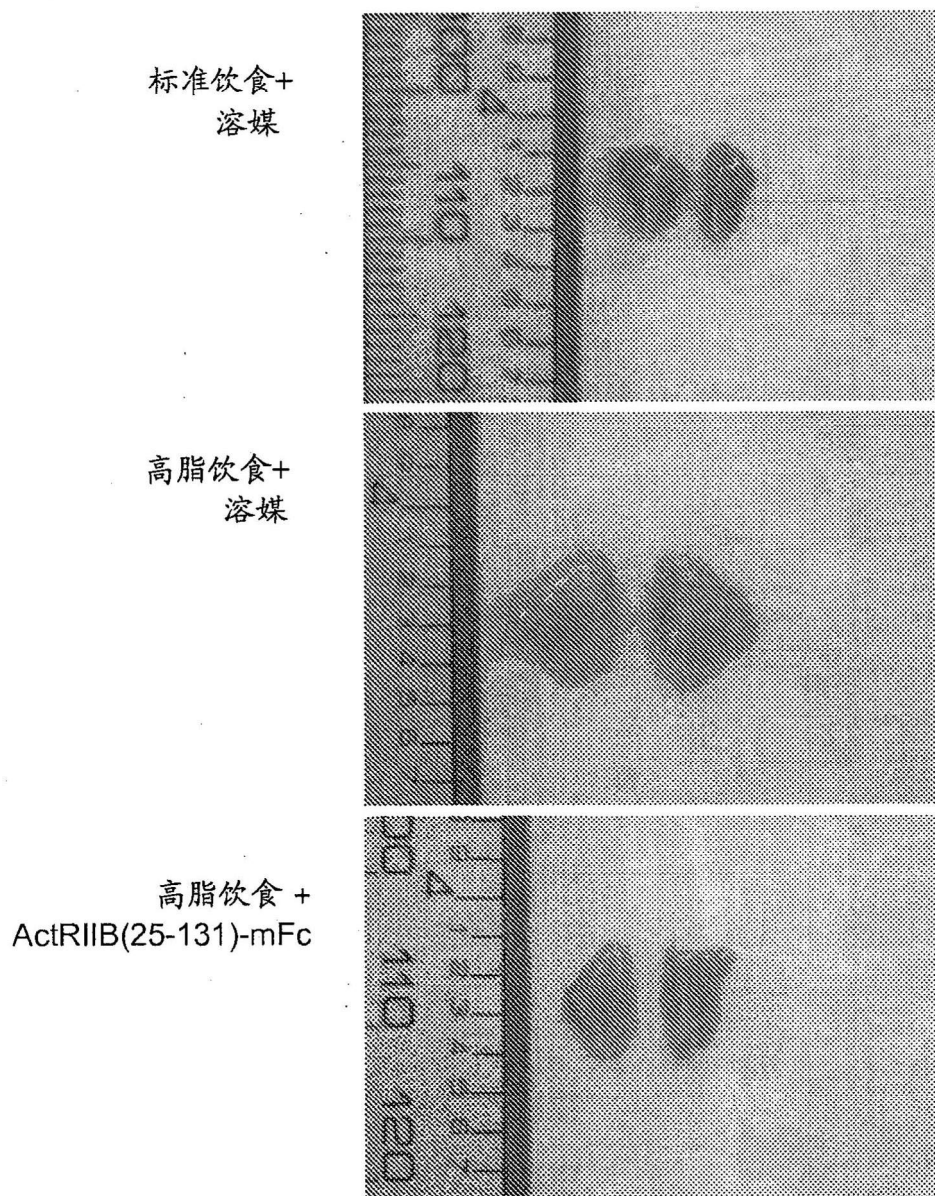


图 23

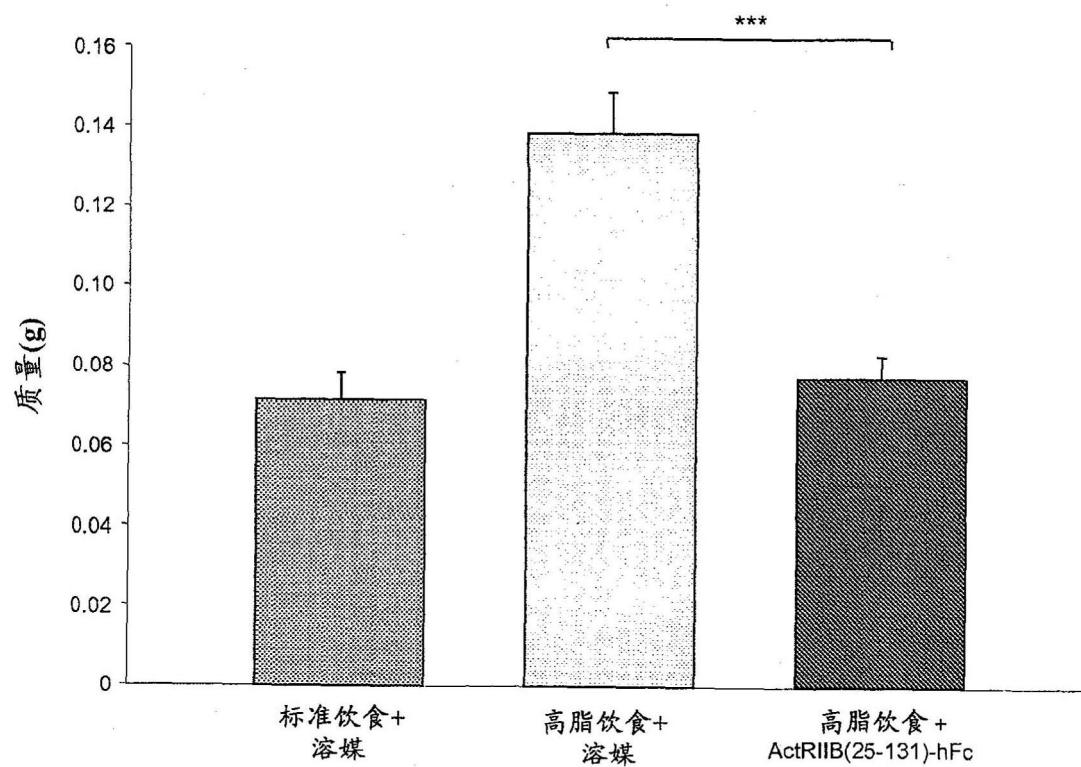


图 24

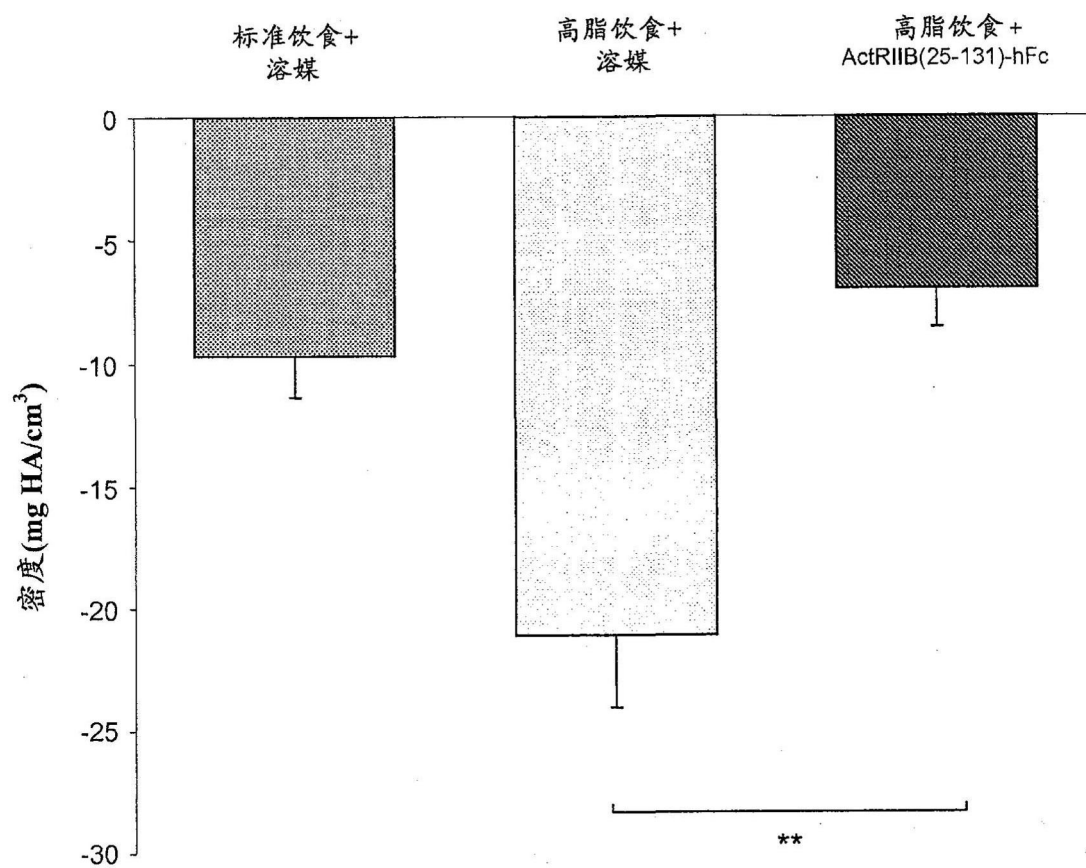


图 25

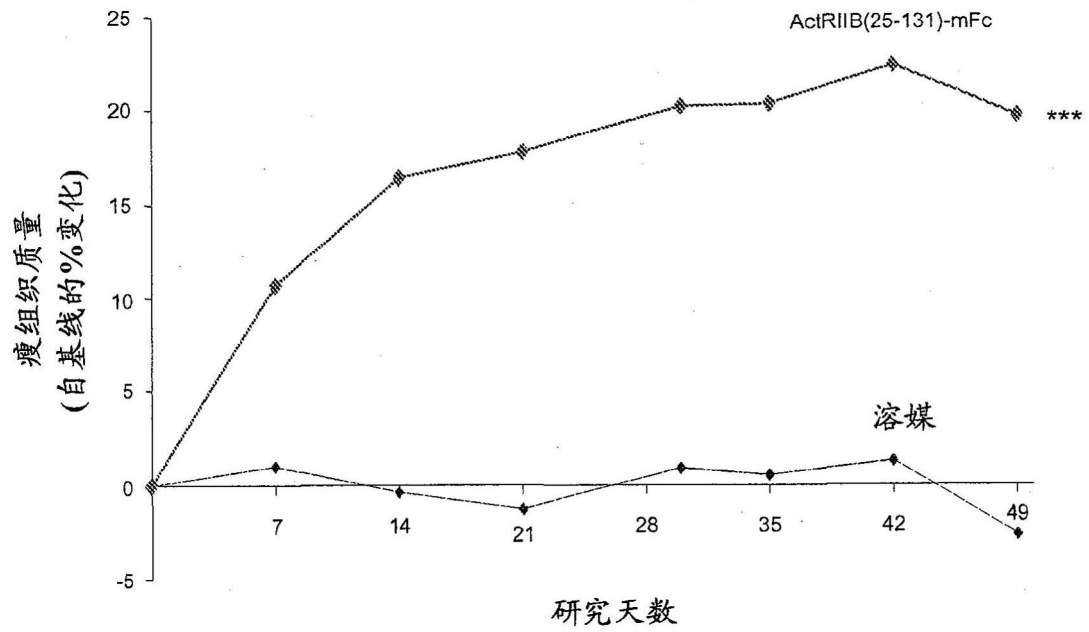


图 26

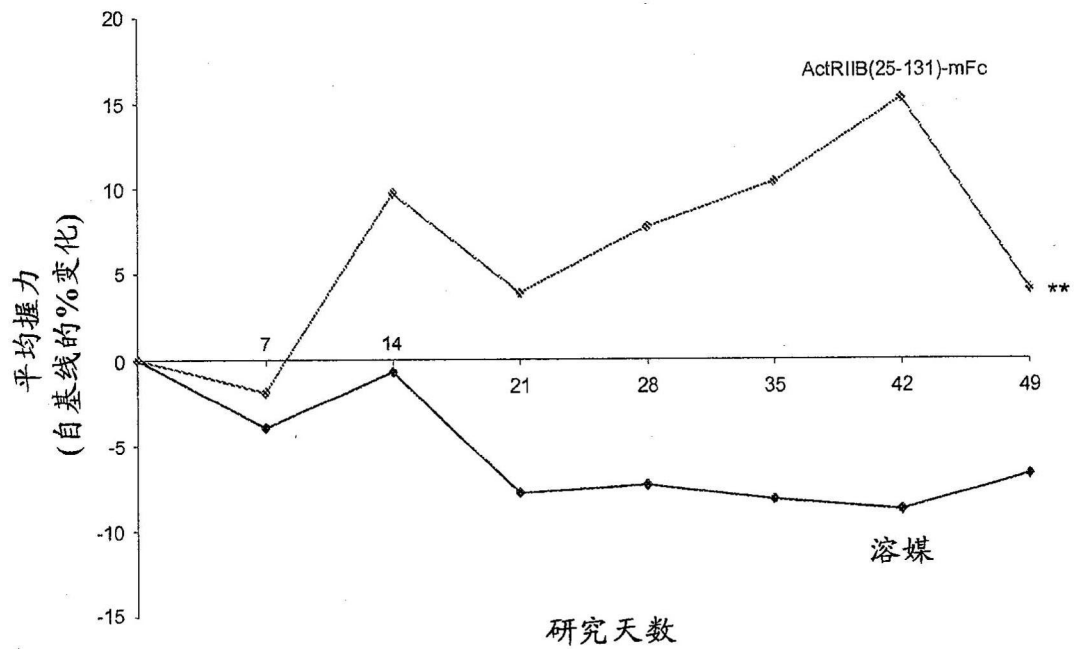


图 27

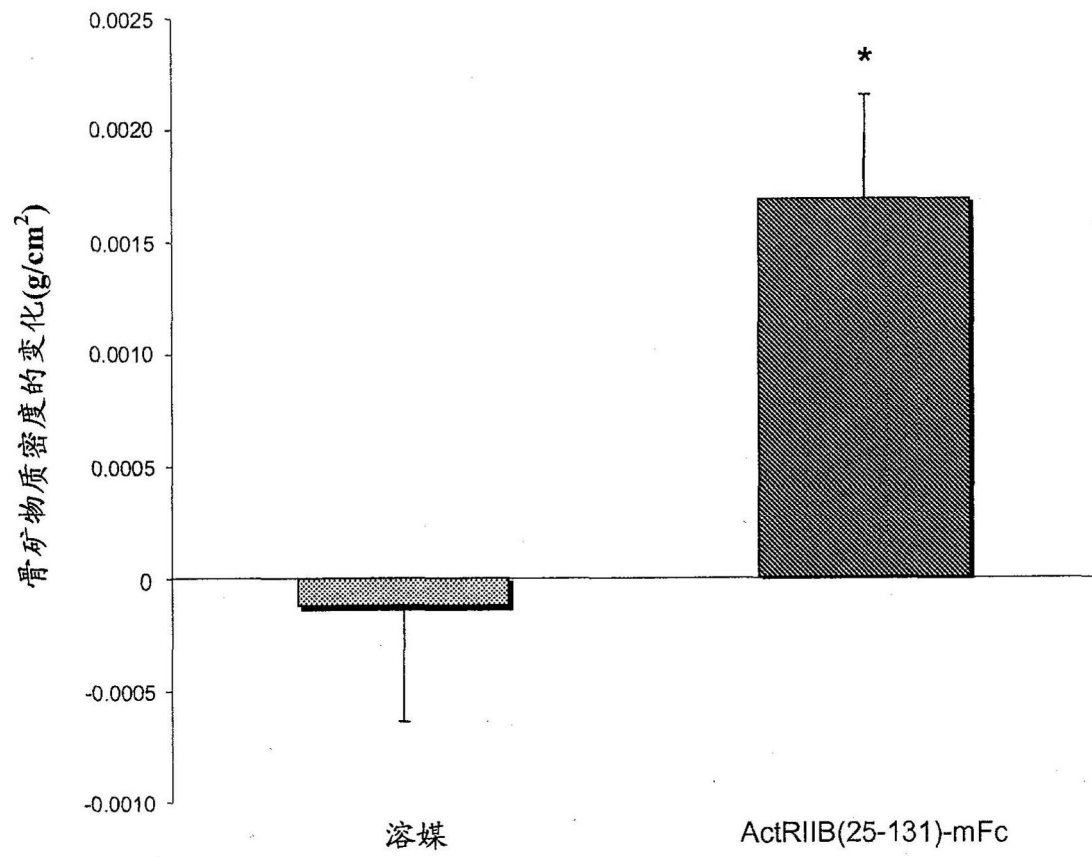


图 28

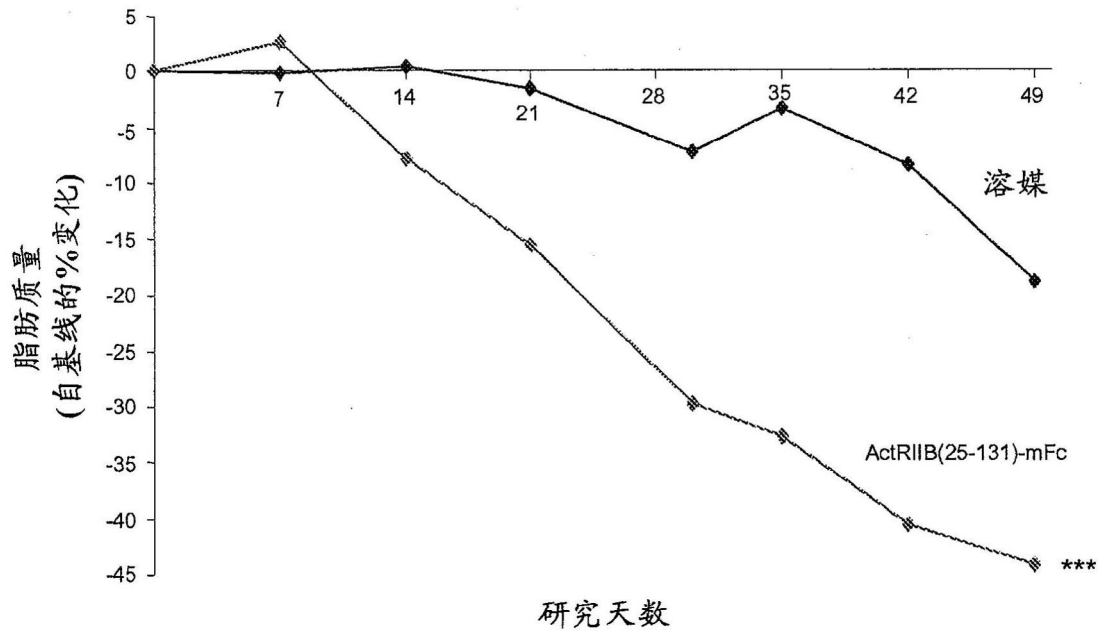


图 29

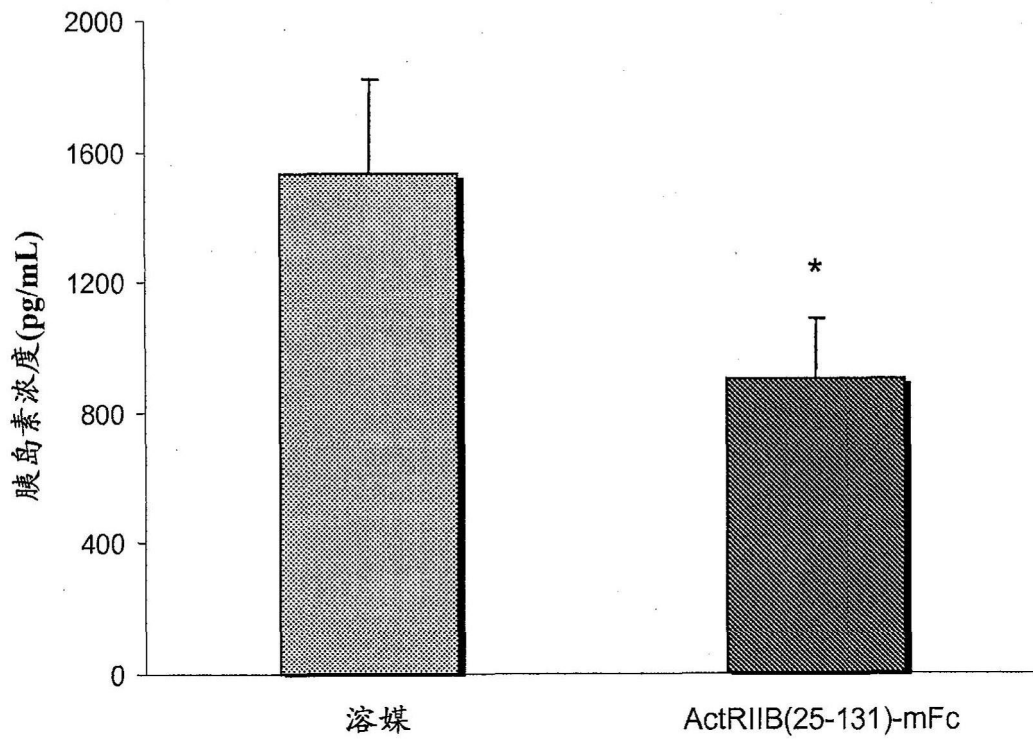


图 30

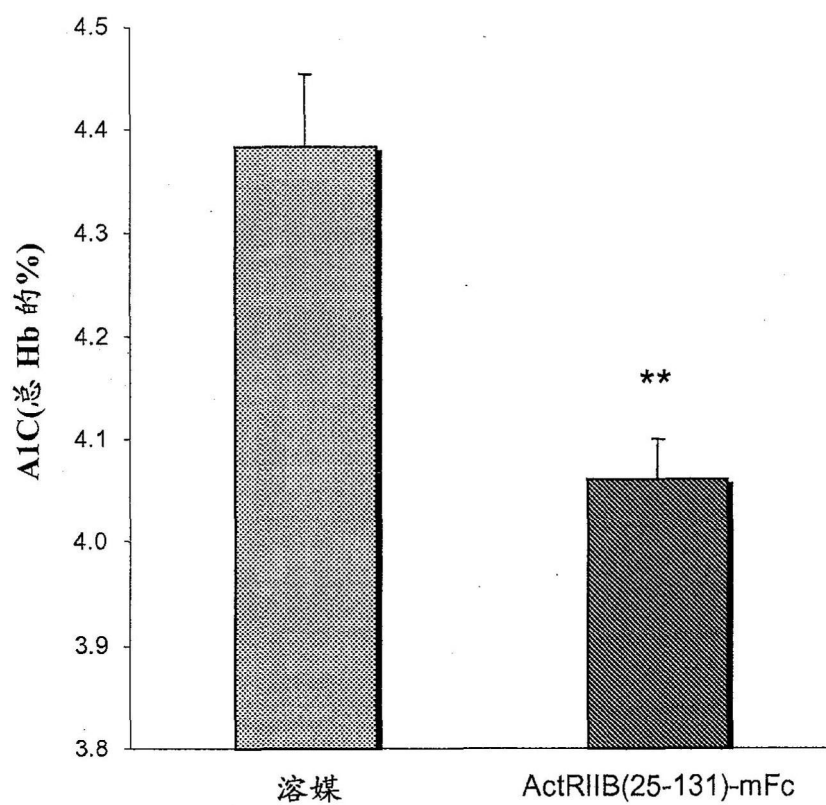


图 31

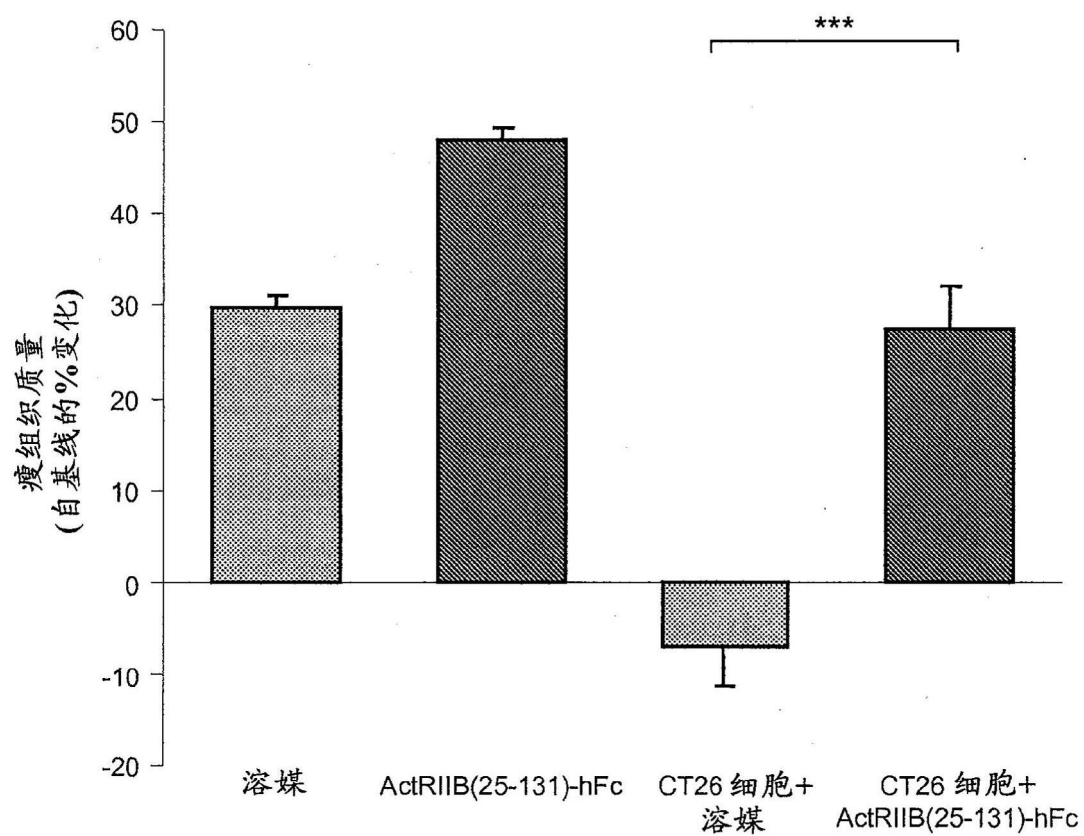


图 32

Abstract

In certain aspects, the present invention provides compositions comprising ActRIIB derived polypeptides. The composition is for modulating (promoting or inhibiting) growth of a tissue, such as bone, cartilage, muscle, fat, brown fat and/or neuronal tissue and for treating metabolic disorders such as diabetes and obesity, as well as disorders associated with any of the foregoing tissue.