



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114245805 A

(43) 申请公布日 2022. 03. 25

(21) 申请号 202080043141.5

J·贝尔克 N·J·夏基

(22) 申请日 2020.05.29

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(30) 优先权数据

62/854,619 2019.05.30 US

代理人 陈晓娜

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.13

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/035141 2020.05.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/243443 EN 2020.12.03

(71) 申请人 艾科赛扬制药股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 J·克诺夫 R·库马尔

A·格林贝格 D·萨科

R·卡斯頓圭 Y·达贡

权利要求书8页 说明书74页

序列表32页

(54) 发明名称

ALK7结合蛋白及其用途

(57) 摘要

本公开提供了ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体以及用于制备所述ALK7结合蛋白的组合物和方法。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白抑制或拮抗ALK7活性。此外,本公开提供了用于诊断和治疗超重、肥胖、糖尿病、超重、肥胖、2型糖尿病和它们的相关疾患;代谢病症以及能够通过靶向ALK7来治疗、预防或改善的其他疾病或疾患的组合物和方法。

1. 一种ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白包含一组CDR:VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3,和/或一组ABR:VH-ABR1、VH-ABR2、VH-ABR3、VL-ABR1、VL-ABR2和VL-ABR3,其中所述CDR和/或ABR来自选自以下的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)对:

- (a) (i) SEQ ID NO:4的VH序列,和
 - (ii) SEQ ID NO:13的VL序列;
 - (b) (i) SEQ ID NO:22的VH序列,和
 - (ii) SEQ ID NO:31的VL序列;
 - (c) (i) SEQ ID NO:40的VH序列,和
 - (ii) SEQ ID NO:49的VL序列;或
 - (d) (i) SEQ ID NO:58的VH序列,和
 - (ii) SEQ ID NO:67的VL序列,
- 其中所述蛋白结合ALK7。

2. 如权利要求1所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白包含一组CDR:VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3,其中所述组的CDR相对于参考组的CDR具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入,在所述参考组的CDR中:

- (a) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;
- (b) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;并且
- (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;
- (c) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;并且
- (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或
- (d) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;并且

(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列，
其中所述蛋白结合ALK7。

3. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白，所述ALK7结合蛋白包含一组CDR，其中：

- (a) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列；
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列；
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列；
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列；并且
- (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；
- (b) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列；
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列；
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列；
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列；
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列；并且
- (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列；
- (c) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列；
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列；
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列；
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列；
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列；并且
- (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列；或
- (d) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列；
- (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列；
- (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列；
- (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列；
- (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列；并且
- (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列，
其中所述蛋白结合ALK7。

4. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白，所述ALK7结合蛋白包含一组ABR：VH-ABR1、VH-ABR2、VH-ABR3、VL-ABR1、VL-ABR2和VL-ABR3，其中所述组的ABR相对于参考组的ABR具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入，在所述参考组的ABR中：

- (a) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列；
- (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:74或69的氨基酸序列；
- (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:75或70的氨基酸序列；
- (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列；
- (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列；并且
- (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列；
- (b) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列；

(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:77或88的氨基酸序列;
(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:78或89的氨基酸序列;
(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;并且
(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
(c) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列;
(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:80或93的氨基酸序列;
(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:81或94的氨基酸序列;
(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;
(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;并且
(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或
(d) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;
(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:83或98的氨基酸序列;
(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:84或99的氨基酸序列;
(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;
(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;并且
(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列,
其中所述蛋白结合ALK7。

5. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白包含一组ABR,其中:

(a) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:74或69的氨基酸序列;
(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:75或70的氨基酸序列;
(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且
(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;
(b) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;
(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:77或88的氨基酸序列;
(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:78或89的氨基酸序列;
(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;并且
(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
(c) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列;
(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:80或93的氨基酸序列;
(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:81或94的氨基酸序列;
(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;
(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;并且
(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或
(d) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;
(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:83或98的氨基酸序列;

- (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:84或99的氨基酸序列;
 - (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;
 - (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;并且
 - (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列,
- 其中所述蛋白结合ALK7。

6. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白包含选自以下的VH和VL对:

- (a) (i) 与SEQ ID NO:4具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和
 - (ii) 与SEQ ID NO:13具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;
 - (b) (i) 与SEQ ID NO:22具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和
 - (ii) 与SEQ ID NO:31具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;
 - (c) (i) 与SEQ ID NO:40具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和
 - (ii) 与SEQ ID NO:49具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;或
 - (d) (i) 与SEQ ID NO:58具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和
 - (ii) 与SEQ ID NO:67具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL,
- 其中所述蛋白结合ALK7。

7. 如权利要求6所述的ALK7结合蛋白,其中所述VH和VL对选自:

- (a) SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列;
 - (b) SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列;
 - (c) SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列;或
 - (d) SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列,
- 其中所述蛋白结合ALK7。

8. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白包含选自以下的VH和VL对:

- (a) (i) 相对于SEQ ID NO:4的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和
- (ii) 相对于SEQ ID NO:13的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;
- (b) (i) 相对于SEQ ID NO:22的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和
- (ii) 相对于SEQ ID NO:31的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、

七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;

(c) (i) 相对于SEQ ID NO:40的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和

(ii) 相对于SEQ ID NO:49的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;或

(d) (i) 相对于SEQ ID NO:58的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和

(ii) 相对于SEQ ID NO:67的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列,

其中所述蛋白结合ALK7。

9. 一种ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白交叉阻断根据任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白与ALK7的结合,或与根据任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白竞争结合ALK7。

10. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白能够拮抗ALK7活性。

11. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白能够增加脂肪细胞中的脂解。

12. 如权利要求11所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白能够增加白色或棕色脂肪细胞中的脂解。

13. 如权利要求9-12中任一项所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白能够拮抗脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制。

14. 如权利要求9-13中任一项所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白能够拮抗白色或棕色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制。

15. 如权利要求11-12中任一项所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白能够使脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%。

16. 如权利要求11-12中任一项所述的ALK7结合蛋白,其中脂解在一种或多种ALK7配体存在下进行的脂解测定中测定。

17. 如权利要求11-16中任一项所述的ALK7结合蛋白,其中所述脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。

18. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,其中所述结合蛋白具有至少一种选自以下的特征:

(a) 降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成;

(b) 与一种或多种II型受体竞争结合ALK7;

(c) 与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7;

(d) 降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化;

(e) 降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化;

(f) 以 $\leq 1\text{nM}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的 K_D (例如如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7;以及

(g) 降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。

19. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,其中所述ALK7结合蛋白增加脂肪细胞中的甘油产生。

20. 如任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白,其中所述ALK7结合蛋白是特异性结合ALK7的抗体。

21. 如权利要求20所述的ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白还在它的重链恒定区中包含LALA或LALA-PG突变。

22. 如权利要求20或21所述的ALK7结合蛋白,其中所述抗体是单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或ALK7结合抗体片段。

23. 如权利要求22所述的ALK7结合蛋白,其中所述ALK7结合抗体片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、微型双功能抗体或单链抗体分子。

24. 如权利要求20-23中任一项所述的ALK7结合蛋白,其中所述抗体还包含选自以下的重链免疫球蛋白恒定结构域:

- (a) 人IgA恒定结构域;
- (b) 人IgD恒定结构域;
- (c) 人IgE恒定结构域;
- (d) 人IgG1恒定结构域;
- (e) 人IgG2恒定结构域;
- (f) 人IgG3恒定结构域;
- (g) 人IgG4恒定结构域;和
- (h) 人IgM恒定结构域。

25. 如权利要求20-24中任一项所述的ALK7结合蛋白,其中所述抗体还包含选自以下的轻链免疫球蛋白恒定结构域:

- (a) 人Ig κ 恒定结构域;和
- (b) 人Ig λ 恒定结构域。

26. 如权利要求20-25中任一项所述的ALK7结合蛋白,其中所述抗体还包含人IgG1重链恒定结构域和人 κ 轻链恒定结构域。

27. 如权利要求20-26中任一项所述的ALK7结合蛋白,其中所述抗体还在它的重链恒定结构域中包含突变、取代或修饰。

28. 一种核酸分子或核酸分子组,所述核酸分子或核酸分子组编码根据任何先前权利要求所述的ALK7结合蛋白。

29. 如权利要求28所述的核酸分子或核酸分子组,所述核酸分子或核酸分子组是cDNA。

30. 一种载体,所述载体包含根据权利要求28-29中任一项所述的核酸分子。

31. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求28-29中任一项所述的核酸分子或权利

要求30所述的载体。

32. 如权利要求31所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

33. 如权利要求31所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是NS0鼠骨髓瘤细胞、PER.C6®人细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

34. 一种制备权利要求1-27中任一项所述的ALK7结合蛋白的方法,所述方法包括在适于产生所述ALK7结合蛋白的条件下培养根据权利要求31-33中任一项所述的宿主细胞。

35. 如权利要求34所述的方法,所述方法还包括分离从所述宿主细胞分泌的ALK7结合蛋白。

36. 一种ALK7结合蛋白,所述ALK7结合蛋白使用权利要求34或35所述的方法来产生。

37. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-27中任一项所述的ALK7结合蛋白和药学上可接受的载体。

38. 根据权利要求37所述的药物组合物,所述药物组合物用作药剂。

39. 权利要求38所述的药物组合物用于治疗 and/或改善与ALK7表达或ALK7信号传导相关的疾病或疾患的用途。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述疾病或疾患是选自以下的成员:肥胖(例如腹部或内脏肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和癌症(例如骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌);和/或与以上疾病或疾患中的一者或多者或与体脂过多相关的其他病症/疾患。

41. 如权利要求37或38所述的药物组合物,其中所述ALK7结合蛋白还包含标记基团或效应物基团。

42. 如权利要求41所述的药物组合物,其中所述效应物基团选自放射性同位素、放射性核素、毒素、治疗剂和化学治疗剂。

43. 一种用于治疗 and/或改善受试者中的与ALK7表达或升高的由ALK7介导的信号传导相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含权利要求1-27中任一项所述的ALK7结合蛋白的组合物或权利要求37、38、41或42所述的药物组合物。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述疾病或疾患是选自以下的成员:肥胖(例如腹部肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和高

血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和癌症(例如骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌);和/或与以上疾病或疾患中的一者或多者或与体脂过多相关的其他病症/疾患。

45. 如权利要求43或44所述的方法,其中单独或以组合疗法形式施用所述ALK7结合蛋白或药物组合物。

46. 一种降低受试者中的ALK7活性的方法,所述方法包括施用根据权利要求1-27中任一项所述的ALK7结合蛋白或权利要求37、38、41或42所述的药物组合物。

47. 一种用于治疗 and/或改善普拉德-威利综合征的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含权利要求1-27中任一项所述的ALK7结合蛋白的组合物或权利要求37、38、41或42所述的药物组合物。

ALK7结合蛋白及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求2019年5月30日提交的美国临时专利申请第62/854,619号的优先权,所述美国临时专利申请据此通过引用以它的整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子提交,并且据此通过引用以它的整体并入本文的序列表。2020年4月10日创建的所述ASCII副本名为APH-00725_SL.txt,并且大小是46,595字节。

背景技术

[0005] 在美国以及全世界的许多国家,超重和肥胖已成为流行病,在所有年龄、种族和民族群组之中以及在男性与女性两者中都在增加。超重和肥胖还与破坏生活活动和生活方式的其他疾病或疾患相关联。肥胖被认为是其他疾病和疾患的严重风险因素,所述其他疾病和疾患诸如是2型糖尿病、炎症和心血管疾病、肺病、脂肪肝病、神经疾病以及肝病和肾病。

[0006] 2型糖尿病是一种同样已成为流行病的慢性进行性疾病。不存在用于II型糖尿病的确定治愈方法,但存在试图延迟或缓和所述疾病的必然后果的众多认可的治疗。2型糖尿病初始通过在膳食和运动方面进行调整以及通过体重减轻来治疗,最尤其是在肥胖受试者的情况下。改善临床表现的体重减轻量有时是不太大的(例如4.4至11磅);这可能归因于对脂肪组织活动的各个方面,例如化学信号传导(尤其是在腹部器官之中以及周围的内脏脂肪组织中)的了解不充分。

[0007] 鉴于前述事项,存在对用于控制和治疗超重、肥胖和2型糖尿病流行病的新型治疗的需要。额外ALK7结合蛋白及其用途将可用于诊断和治疗、预防和/或改善超重、肥胖、2型糖尿病和它们的相关疾患;代谢病症以及可通过靶向ALK7来治疗、预防或改善的其他疾病或疾患。

发明内容

[0008] 本公开提供了ALK7结合蛋白和使用所述ALK7结合蛋白的方法。在特定实施方案中,ALK7结合蛋白能够抑制或阻断ALK7与一种或多种同源ALK7配体和/或一种或多种同源ActRI受体的结合。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白能够抑制或阻断ALK7和ActRII受体(ActRIIA或ActRIIB)以及GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B或Nodal的多聚化。本公开还提供了使用ALK7结合蛋白诊断或治疗、预防和/或改善与ALK7表达和/或升高的由ALK7介导的信号传导相关的疾病或疾患的方法。此类疾病或疾患包括但不限于超重、肥胖(例如腹部肥胖);胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、纤维蛋白溶解紊乱、动脉粥样硬

化;动脉硬化和高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和癌症(例如骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌);以及与以上疾病或疾患中的一者或多者或与体重过大(例如体质指数(BMI) $\geq 25\text{kg/m}^2$)或体脂过多相关的其他病症/疾患。本公开还提供了但不限于用于使用拮抗剂ALK7结合蛋白诸如抗体来减轻体重(例如促进体重减轻)的方法,以及用于使用拮抗剂ALK7结合蛋白诸如抗体来减少体重增加(例如预防体重增加)的方法。

[0009] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7。在其他实施方案中,提供的ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且具有至少一种选自以下的特征:(a)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成;(b)与ActRIIA或ActRIIB竞争结合ALK7;(c)与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7;(d)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化;(e)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化;(f)以 $\leq 1\text{nM}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的 K_D (例如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7,以及(g)降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的2者、3者或4者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的至少2者、至少3者或至少4者。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0010] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含一组互补决定区(CDR):重链可变区(VH)-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、轻链可变区(VL)-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3,其中所述CDR存在于表1中公开的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)对中。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含存在于选自以下的VH和VL对中的一组CDR:(a)SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列;(b)SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列;(c)SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列;和(d)SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列。

[0011] 在额外实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组CDR:VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3,其中所述组的CDR与参考组的CDR同一,或

相对于所述参考组的CDR具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或少于十个氨基酸取代、缺失和/或插入,在所述参考组的CDR中:(a) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(b) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;(c) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或(d) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0012] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组CDR,其中:(a) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(b) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;(c) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或(d) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;(ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;(iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;(iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;(v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;并且(vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0013] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含一组抗原结合区(ABR):重链可变区(VH)-ABR1、VH-ABR2、VH-ABR3、轻链可变区(VL)-ABR1、VL-ABR2和VL-ABR3,其中所述ABR存在于表1中公开的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)对中。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含存在于选自以下的VH和VL对中的一组ABR:(a) SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列;(b) SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列;(c) SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列;和(d) SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列。

[0014] 在额外实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组ABR:VH-ABR1、VH-ABR2、VH-ABR3、VL-ABR1、VL-ABR2和VL-ABR3,其中所述组的ABR与参考组的ABR同一,或相对于所述参考组的ABR具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十

个或少于十个氨基酸取代、缺失和/或插入,在所述参考组的ABR中:(a) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:74或69的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:75或70的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;(b) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:77或88的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;(c) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:80或93的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:81或94的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或(d) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:83或98的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:84或99的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0015] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组abr,其中:(a) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:74或69的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:75或70的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;(b) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:77或88的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;(c) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:80或93的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:81或94的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或(d) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;(ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:83或98的氨基酸序列;(iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:84或99的氨基酸序列;(iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;(v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;并且(vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0016] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含选自以下的VH和VL对:(a) (i) 与SEQ ID NO:4具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii) 与SEQ ID NO:13具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;(b) (i) 与SEQ ID NO:22具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii) 与SEQ ID NO:31具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;(c) (i) 与SEQ ID NO:40具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii) 与SEQ ID NO:49具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;以及(d) (i) 与SEQ ID NO:58具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii) 与SEQ ID NO:67具有至少90%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%序列同一性的VL;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0017] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含选自以下的VH和VL对:(a) (i) 相对于选自SEQ ID NO:4的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii) 相对于SEQ ID NO:13的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;(b) (i) 相对于SEQ ID NO:22的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii) 相对于SEQ ID NO:31的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;(c) (i) 相对于SEQ ID NO:40的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii) 相对于SEQ ID NO:49的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;以及(d) (i) 相对于SEQ ID NO:58的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii) 相对于SEQ ID NO:67的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0018] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是特异性结合ALK7的抗体。在额外实施方案中,抗体是单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7结合抗体片段。在一些实施方案中,抗体是选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、微型双功能抗体、DART和单链抗体分子(例如BiTE)的抗体片段。

[0019] 还提供了编码ALK7结合蛋白的核酸和核酸组。还提供了含有核酸和核酸组的载体和载体组,以及用核酸和载体转化的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是杂交瘤或哺乳动物宿主细胞,诸如NS0鼠骨髓瘤细胞、PER.C6®人细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。还提供了产生ALK7结合蛋白的宿主细胞,包括哺乳动物宿主细胞和杂交瘤。

[0020] 还提供了用于制备ALK7结合蛋白的方法。在一些实施方案中,方法包括在适于表达蛋白的条件下培养能够表达ALK7结合蛋白的宿主细胞,以及任选地分离所表达ALK7结合蛋白。还提供了使用本文公开或另外在本领域中已知的方法制备和/或分离的ALK7结合蛋白。

[0021] 还提供了包含ALK7结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗 and/或改善受试者中与升高的ALK7表达或由ALK7介导的信号传导相关,或可通过降低ALK7信号传导来治疗和/或改善的疾患的方法。在一些实施方案中,方法降低受试者中ALK7介导的信号传导。

[0022] 受试者中的可使用提供的方法治疗和/或改善的疾患包括但不限于:肥胖(例如腹部肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如

包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、纤维蛋白溶解紊乱、动脉粥样硬化；动脉硬化和高血压；综合征X；血管再狭窄；神经病变；视网膜病变；神经变性疾病；内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病（例如肾病变）；胰腺炎；多囊卵巢综合征；尿酸水平升高；血色素沉着症（铁过载）；黑棘皮症（皮肤上有暗斑）；和癌症（例如骨髓瘤（多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤）、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌和/或结肠癌）；以及与以上疾病或疾患中的一者或多者或与超重（例如BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ ）或体脂过多相关的其他病症/疾患。

[0023] 在一些实施方案中，所公开方法包括将包含有效量的ALK7结合蛋白（例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体）的药物组合物施用至有需要的受试者。在一些实施方案中，单独施用ALK7结合蛋白。在其他实施方案中，以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在其他实施方案中，以与护理标准治疗/疗法的组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。

[0024] 还提供了阻断或降低ALK7活性（例如配体结合和/或信号传导）的方法。在一些实施方案中，方法包括使ALK7结合蛋白和表达ALK7的细胞（例如分化的白色或棕色脂肪细胞）接触。在一些情况下，方法包括在GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和/或Nodal存在下使ALK7结合蛋白和表达ALK7的细胞接触。在一些实施方案中，方法在体内进行。在其他实施方案中，方法在体外进行。在一些实施方案中，阻断或降低的ALK7活性是ALK7的磷酸化。在额外实施方案中，阻断或降低的ALK7活性是Smad（例如Smad2和/或Smad3）的磷酸化。在一些实施方案中，本公开提供了一种阻断或降低受试者中的ALK7活性的方法，所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白施用至有需要的受试者。

[0025] 还提供了一种阻断或降低与ALK7表达和/或ALK7信号传导相关的病理性疾患中，或可通过降低或抑制ALK7配体的活性来治疗和/或改善的病理性疾患中的ALK7活性的方法。在一些情况下，方法包括将ALK7结合蛋白施用至具有增加的ALK7或ALK7配体表达的受试者。在一些实施方案中，病理性疾患是肥胖、糖尿病、代谢疾病、血脂异常；心血管疾病、2型糖尿病、炎症、或肺病、脂肪肝病、神经疾病和肝病或肾病。

[0026] 在另一方面，本公开提供了一种治疗或改善超重或与处于超重相关的疾患的方法，所述方法包括向超重受试者施用有效量的ALK7结合蛋白（例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体）。在某些实施方案中，治疗或改善的疾患是肥胖。在其他实施方案中，治疗或改善的疾患是选自血脂异常、高脂血症、高胆固醇血症、低HDL血清水平、高LDL血清水平（例如LDL-C $\geq 100\text{mg/dL}$ 、 $\geq 130\text{mg/dL}$ 、 $\geq 160\text{mg/dL}$ ）和高甘油三酯血症（例如TG $\geq 150\text{mg/dL}$ 、 $\geq 160\text{mg/dL}$ 、 $\geq 170\text{mg/dL}$ ）的成员。在其他实施方案中，治疗或改善的疾患是高血压。在其他实施方案中，治疗或改善的疾患是糖尿病。在某些此类实施方案中，施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂，诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中，施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中，施用的ALK7结合蛋白包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中，施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合，或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中，施用的ALK7结合蛋白包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中，施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合，或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0027] 在另一方面，本公开提供了一种治疗或改善肥胖或与肥胖相关的疾患的方法，所

述方法包括向肥胖受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体)。在某些此类实施方案中,治疗或改善的疾患是高血压、血脂异常(例如高总胆固醇、或高甘油三酯水平)2型糖尿病、冠心病、中风、胆囊疾病、骨关节炎、睡眠障碍、呼吸问题、癌症(例如骨髓瘤(多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌和/或结肠癌)、肥胖关联的胆囊疾病、肥胖关联的炎症、肥胖诱发的睡眠呼吸暂停、脂肪变性(脂肪肝)、胰高血糖素瘤、动脉硬化或心力衰竭。在一些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现高血压、血脂异常(例如高总胆固醇、或高甘油三酯水平)、2型糖尿病、冠心病、中风、胆囊疾病、骨关节炎、睡眠障碍、呼吸问题、癌症(例如骨髓瘤(多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌)、肥胖关联的胆囊疾病、肥胖关联的炎症、肥胖诱发的睡眠呼吸暂停、脂肪变性、胰高血糖素瘤、动脉硬化或心力衰竭的风险下。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中,施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0028] 在另一方面,本公开提供了一种治疗或改善II型糖尿病或与II型糖尿病相关的疾患的方法,所述方法包括向糖尿病受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体)。在相关实施方案中,本公开提供了一种治疗或改善与II型糖尿病相关的疾患的方法,所述疾患诸如是:眼疾患(例如青光眼、白内障和视网膜病变)、心血管疾病(例如高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死和中风)、高血糖症、周围神经病和肾病(例如肾病变)。在某些实施方案中,受试者处于显现II型糖尿病或与II型糖尿病相关的疾患的风险下,所述疾患诸如是:眼疾患(例如青光眼、白内障和视网膜病变)、心血管疾病(例如高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死、纤维蛋白溶解紊乱和中风)、高血糖症、周围神经病或肾病(例如肾病变)。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中,施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0029] 在另一方面,本公开提供了一种治疗或改善代谢疾病或病症或与代谢疾病或病症相关的疾患的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体)施用至有需要的受试者。在某些此类实施方案中,治疗或改善的疾患是脂质、脂蛋白或载脂蛋白代谢的改变。在其他此类实施方案中,代谢疾患是高血浆甘油三酯水平、高血压、血脂异常、高空腹血糖、低HDL胆固醇水平。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是动脉粥样硬化、动脉硬化或内皮功能异常。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是慢性炎症。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是非酒精性脂肪肝病(例如脂肪肝和/或NASH)。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中,施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白包含表1中公开的VH和

VL对。在相关实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0030] 在另一方面,本公开提供了一种治疗或改善胰岛素抵抗或与胰岛素抵抗相关的疾患的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体)施用至有需要的受试者。在某些此类实施方案中,治疗或改善的疾患与葡萄糖耐量受损或高血糖症相关。在其他此类实施方案中,治疗或改善的疾患与高血压或动脉粥样硬化相关。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是选自以下的成员:血脂异常、高脂血症、高胆固醇血症、低HDL血清水平、高LDL血清水平(例如LDL-C $\geq$ 100mg/dL、 $\geq$ 130mg/dL、 $\geq$ 160mg/dL)和高甘油三酯血症(例如TG $\geq$ 150mg/dL、 $\geq$ 160mg/dL、 $\geq$ 170mg/dL)。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中,施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0031] 在另一方面,本公开提供了一种治疗或改善眼、神经系统、肾、肺和/或肝的疾病或病症或相关疾患的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体)施用至有需要的受试者。在某些此类实施方案中,治疗或改善的疾患是炎症。在其他此类实施方案中,治疗或改善的疾患是肾病变(例如糖尿病性肾病变)、肾动脉的动脉硬化、或肾衰竭。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是慢性炎症。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是脂肪组织炎症。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是肝脏炎症。在其他实施方案中,治疗或改善的疾患是NAFLD(例如脂肪肝和/或NASH)。在一些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现肾、肺或肝的疾病或病症的风险下。在一些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现肾病变的风险下。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现慢性炎症的风险下。在其他实施方案中,受试者处于显现脂肪组织炎症的风险下。在其他实施方案中,受试者处于显现肝脏炎症的风险下。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中,施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0032] 在另一方面,本公开提供了一种治疗或改善心血管疾病或病症或与心血管疾病或病症相关的疾患的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂ALK7结合蛋白诸如拮抗剂抗ALK7抗体)施用至有需要的受试者。在某些此类实施方案中,治疗或改善的疾患是冠心病、充血性心力衰竭、血管再狭窄、中风、外周血管疾病、微血管疾病、纤维蛋白溶解紊乱或动脉硬化。在其他实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现冠心病、充血性心力衰竭、血管再狭窄、中风、外周血管疾病、微血管疾病或动脉硬化的风险下。在某些实施方案中,治疗或改善的疾患是高血压(例如在静息状态下的血压 $>130/80$ mmHg)。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现高血压的风险下。在其他实

施方案中,治疗或改善的疾患是动脉粥样硬化。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者处于显现动脉粥样硬化的风险下。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些此类实施方案中,施用的拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。在某些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白包含表1中公开的VH和VL对。在相关实施方案中,施用的ALK7结合蛋白交叉阻断包含表1中公开的VH和VL序列对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。

具体实施方式

[0033] 本公开提供了经分离和/或重组ALK7结合蛋白。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体。

[0034] 还提供了编码ALK7结合蛋白的核酸、含有所述核酸的载体和宿主细胞,以及制备和使用ALK7结合蛋白的方法。提供的ALK7结合蛋白在诊断、治疗和/或改善与增加的ALK7表达和/或信号传导相关的疾病和疾患方面具有用途。此类用途包括但不限于预防和/或改善肥胖(例如腹部肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和癌症(例如骨髓瘤(多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌和/或结肠癌);以及与以上疾病或疾患中的一者或多者或与超重(例如25kg/m²的BMI)或体脂过多相关的其他病症/疾患。

[0035] 定义

[0036] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本公开所相关的领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。举例来说,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology,Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC Press;The Dictionary of Cell and Molecular Biology,第3版,1999,Academic Press;以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology,修订版,2000,Oxford University Press对技术人员提供本公开中使用的许多术语的综合词典。本文提供的标题不是对各种实施方案的限制,所述各种实施方案可通过参考说明书整体而得到。此外,通过参考说明书整体,以下紧接着定义的术语得到更充分阐释。

[0037] 除非使用术语所处的上下文另外明确规定,否则术语“一个(种)”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。术语“一个(种)”以及术语“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”可在本文中互换使用。此外,当在本文中使用,“和/或”应视为具体公开两个或更多个指定特征或组分中的每一者,伴有或不伴有其他指定特征或组分。因此,如本文在诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下实施方案中的每一者:A、B

和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0038] 术语“包含”通常以包括的意义使用,也就是说容许存在一个或多个特征或组分。每当在本文中措辞“包含”描述实施方案时,也提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的另外类似实施方案。

[0039] 如在整篇说明书和权利要求中与数值关联使用的术语“约”和“近似”表示为本领域技术人员所熟悉和可接受的精度区间。一般来说,此精度区间是 $\pm 10\%$ 。或者,并且特别是在生物系统中,术语“约”和“近似”可意指值在给定值的某一数量级内,优选是 ≤ 5 倍,并且更优选是 ≤ 2 倍。

[0040] 数值范围包括界定范围的数值。

[0041] ALK7结合蛋白是指特异性结合ALK7,优选是结合ALK7的细胞外结构域的蛋白质。

[0042] 术语“ALK7”和“ALK7受体”可互换使用,并且是指ALK7(在文献中也被称为ACVRLK7、IC型活化素A受体、ACVR-1C、活化素受体样激酶7和EC 2.7.11)。人ALK7的参考序列以NCBI参考序列NP_001104501.1提供。提供的ALK7结合蛋白结合对应于SEQ ID NO:85的氨基酸序列的人ALK7的细胞外结构域。大鼠ALK7的参考序列以NCBI参考序列P70539提供。在一些实施方案中,提供的ALK7结合蛋白结合对应于SEQ ID NO:86的氨基酸序列的大鼠ALK7的细胞外结构域。

[0043] 当在ALK7结合蛋白(例如中和抗体)的情形下使用时,术语“竞争”意指抗原结合蛋白之间的如通过测定所测定的竞争,在所述测定中,所测试的抗原结合蛋白(例如抗ALK7抗体或其ALK7结合片段)阻止或抑制参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如ALK7细胞外结构域或其片段)的特异性结合。可使用众多类型的竞争性结合测定,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)(参见例如Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.32:77-82(1990)以及Morel等人,Molec.Immunol.25:7-15(1988))、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、固相直接生物素-亲和素EIA(参见例如Cheung等人,Virology176:546-552(1990)以及Kirkland等人,J.Immunol.137:3614-3619(1986))和夹心式竞争测定(参见例如Stahli等人,Methods in Enzymology 92:242-253(1983))。通常,此种测定涉及使用结合于携带未标记测试抗原结合蛋白和经标记参考抗原结合蛋白中的任一者的固体表面或细胞的纯化抗原。

[0044] 可通过测定在测试抗原结合蛋白存在下结合于固体表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定鉴定的抗原结合蛋白(竞争性抗原结合蛋白)包括与参考ALK7结合蛋白结合相同表位的ALK7结合蛋白,以及结合足够接近于由参考ALK7结合蛋白结合的表位的邻近表位以达成存在空间位阻的ALK7结合蛋白。通常,当竞争性ALK7结合蛋白过量存在时,它将使参考ALK7结合蛋白与ALK7的特异性结合抑制至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在某一情况下,竞争性抗原结合蛋白使参考ALK7结合蛋白的特异性结合抑制至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0045] 当在ALK7蛋白的情形下使用时,术语“表位”是指能够结合本公开的ALK7结合蛋白(例如抗体)的ALK7(例如人ALK7或鼠ALK7)蛋白决定簇。表位通常由分子诸如氨基酸或糖侧链的化学活性表面集团组成,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。构象性表位和非构象性表位的区别在于在变性溶剂存在下,与前者而非与后者的结合丧失。可容

易地使用本领域中已知的技术确定由ALK7结合蛋白结合的ALK7表位。

[0046] 本文公开的抗原结合蛋白诸如抗ALK7结合抗体及其ALK7结合片段、变体或衍生物可以抗原的一个或多个表位或一个或多个部分例如它们识别或特异性结合的靶标多肽来描述或指定。举例来说,ALK7的与本文公开的ALK7结合蛋白的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”。表位可由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠而毗连的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常得到保留,而通过三级折叠形成的表位在使用变性溶剂处理时通常丧失。表位决定簇可包括分子诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基的化学活性表面集团,并且可具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。表位通常包括呈独特空间构象的至少3、4、5、6、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35个氨基酸。可常规地使用本领域中已知的方法确定表位。

[0047] 术语“抑制”、“阻断”、“降低”、“降低”、“阻抑”、“拮抗”和“中和”可互换使用,并且是指活性(例如ALK7配体结合和/或ALK7信号传导)的任何统计显著降低,包括完全阻断活性。举例来说,“抑制”、“阻抑”或“拮抗”可指相较于对照,活性降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0048] 在一些实施方案中,术语“降低”、“抑制”或“拮抗”可指相对于当未与ALK7结合蛋白接触时的细胞中的Smad磷酸化程度,ALK7结合蛋白诸如抗体或其ALK7结合片段能够统计显著(例如p值小于或等于0.05)降低一种或多种Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化,所述磷酸化由使表达ALK7和ActrIIA/B的细胞与ALK7配体诸如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和/或Nodal接触所诱导。表达ALK7的细胞可为天然存在的细胞或细胞系,或可通过将编码ALK7的核酸引入至宿主细胞中来重组产生。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白例如ALK7抗体或其ALK7结合片段使ALK7配体介导的对一种或多种Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化拮抗(降低)至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如例如通过蛋白质印迹,随后用抗磷酸酪氨酸抗体探测,或通过ELISA(例如P-Smad ELISA)或Smad依赖性报告基因测定,使用本文所述或另外在本领域中已知的技术所测定。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白拮抗(降低)脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,并且使白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制拮抗5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制降低或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。

[0049] 在某些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂,并且使白色和/或棕色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制拮抗5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白使白色和/或棕色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制降低或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7

配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。

[0050] 术语“增加”、“促进”和“激动剂”可互换使用,并且是指活性(例如ALK7配体结合和/或ALK7信号传导)的任何统计显著增加。举例来说,“增加”或“促进”可指相较于对照,活性增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0051] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加细胞中的脂解。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加脂肪细胞中的脂解。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加白色脂肪细胞或棕色脂肪细胞中的脂解。

[0052] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加白色脂肪细胞中的脂解。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。

[0053] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加棕色脂肪细胞中的脂解。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使棕色脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。

[0054] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加白色和棕色脂肪细胞中的脂解。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使白色和棕色脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。

[0055] 在额外实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在活化素B(50ng/ml)存在下进行的脂解测定中使用标准技术和条件所测定(例如如本文实施例中所述)。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制降低或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如在脂解抑制测定中使用标准

技术和条件所测定。在某些此类实施方案中,脂解测定在活化素B (50ng/ml) 存在下进行(例如如本文实施例中所述)。

[0056] 在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色和/或棕色脂肪细胞中的脂解增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在活化素B (50ng/ml) 存在下进行的脂解测定中使用标准技术和条件所测定(例如如本文实施例中所述)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制降低或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如在脂解抑制测定中使用标准技术和条件所测定。在某些此类实施方案中,脂解测定在活化素B (50ng/ml) 存在下进行(例如如本文实施例中所述)。

[0057] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加脂肪细胞中的甘油产生。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的甘油产生增加至少5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白增加白色脂肪细胞或棕色脂肪细胞中的甘油产生。

[0058] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用,并且包括完整(全长)抗体及其抗原结合片段或单链。典型抗体包含由二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链。每个重链包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,即CH1、CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,即CL。VH区和VL区可被进一步再分成被称为互补决定区(CDR)的高变区,所述高变区散布着被称为框架区(FW)的更保守区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FW组成,从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。示例性抗体包括典型抗体、scFv,以及它们的组合,其中例如scFv共价连接(例如通过肽键或通过化学接头)于典型抗体的重链和/或轻链的N末端或C末端,或插入在典型抗体的重链和/或轻链中。

[0059] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)衍生物和突变体、多特异性抗体诸如双特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白,以及包含抗原识别位点的任何其他经修饰免疫球蛋白分子,只要抗体展现所需结合活性即可。基于抗体的分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链恒定结构域的身份,抗体可属于免疫球蛋白的5个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM或它们的子类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)中的任一者。不同类别的免疫球蛋白具有不同和熟知的亚单位结构和三维构型。抗体可为裸露的,或缀合于其他分子诸如毒素、放射性同位素等。术语“IgG”是指属于大致上由公认的免疫球蛋白 γ 基因编码的抗体的类别的多肽。在人中,这个类别包含IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中,这个类别包含IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。

[0060] 术语“ALK7抗体”、“结合ALK7的抗体”或“抗ALK7抗体”是指以下抗体：所述抗体能够以足够亲和力结合ALK7以致所述抗体可用作分别靶向ALK7的治疗剂或诊断试剂。

[0061] 就当在ALK7蛋白的情形下使用时的“特异性结合”来说，它通常意指相比于结合蛋白结合无关对照蛋白质，所述结合蛋白诸如抗体能够以更大亲和力结合ALK7（例如人ALK7，优选是ALK7的细胞外结构域）。在一些实施方案中，对照蛋白质是母鸡卵白溶菌酶。优选地，相比于对对照蛋白质的亲和力，结合蛋白以至少100、500或1000倍大的亲和力结合ALK7。优选地，结合蛋白对人ALK7具有 $\leq 1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或 $\leq 1 \times 10^{-8}$ 的结合亲和力，如使用本领域中已知的结合测定所测量。在一些实施方案中，使用放射免疫测定（RIA）或 **BIACORE®**（例如使用ALK7作为分析物，并且使用ALK7结合蛋白作为配体，或反之亦然）测量结合亲和力。

[0062] 在一些实施方案中，ALK7结合蛋白（例如抗ALK7抗体）与无关非ALK7蛋白的结合程度小于ALK7结合蛋白与ALK7的结合的约10%，如例如通过放射免疫测定（RIA）、**BIACORE®**（使用重组ALK7作为分析物，并且使用ALK7结合蛋白作为配体，或反之亦然）、动力学排除测定（**KINEXA®**）或本领域中已知的其他结合测定所测量。在某些实施方案中，ALK7结合蛋白是具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{nM}$ 、 $\leq 10 \text{nM}$ 、 $\leq 1 \text{nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{nM}$ 、 $\leq 10 \text{pM}$ 、 $\leq 1 \text{pM}$ 或 $\leq 0.1 \text{pM}$ 的解离常数（ K_D ）的全长抗体或ALK7结合抗体片段。

[0063] 术语“抗原结合抗体片段”（例如“ALK7结合抗体片段”）是指含有完整抗体的抗原结合可变区的全部或一部分（例如CDR3）的片段。已知的是抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段执行。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、单链抗体和由一个或多个抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施方案中，本公开提供了ALK7结合抗体片段，其中抗体片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、微型双功能抗体或单链抗体分子。

[0064] Fc区包括包含抗体的排除第一恒定区免疫球蛋白结构域的恒定区的多肽。因此，Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域，以及IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域，和在这些结构域的N末端的柔性铰链。对于IgA和IgM，Fc可包括J链。对于IgG，Fc包含免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3以及在C γ 1与C γ 2之间的铰链。尽管Fc区的边界可变化，但人IgG重链Fc区通常被定义为包含残基C226或P230直至它的羧基末端，其中编号根据如Kabat（Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版Public Health Service，NIH，Bethesda，Md.（1991））中阐述的EU索引。Fc可指单独这个区域，或在完整抗体、抗体片段或Fc融合蛋白的情形下的这个区域。已在许多不同Fc位置处观察到多态性，包括但不限于如根据EU索引加以编号的位置270、272、312、315、356和358，因此，在呈现的序列与先前技术中的序列之间可能存在微小差异。

[0065] “单克隆抗体”是指单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合中涉及的同质性抗体群体。这不同于通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体。术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段（诸如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv）、单链（scFv）突变体、和包含抗体部分的融合蛋白、和包含抗原识别位点的任何其他经修饰免疫球蛋白分子。可以许多方式制备单克隆抗体，包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0066] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源于两个或更多个物种

的抗体。通常,轻链与重链两者的可变区均对应于源于一个哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔等),具有所需抗原结合特异性、亲和力和/或能力的抗体的可变区,而恒定区与源于另一物种(通常是人)的抗体中的序列同源以避免在那个物种中引发免疫应答。

[0067] 术语“人源化抗体”是指源于非人(例如鼠)免疫球蛋白的抗体,其已被工程改造来含有较少,优选是最少非人(例如鼠)序列。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中来自CDR的残基被来自非人物种(例如小鼠、大鼠、兔或仓鼠)的CDR的具有所需抗原结合特异性、亲和力和/或能力的残基替换(Jones,Nature 321:522-525(1986);Riechmann,Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen,Science 239:1534-1536(1988))。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FW)残基被来自非人物种,具有所需抗原结合特异性、亲和力和/或能力的抗体中的相应残基替换。可通过取代在Fv框架区中和/或在替换的非人残基内的额外残基来进一步修饰人源化抗体以细化和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般来说,人源化抗体将包含大致上全部的至少一个,并且通常是两个或三个可变结构域,所述可变结构域含有全部或大致上全部的对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而全部或大致上全部的FR区是具有人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可包含至少一部分免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),通常是人免疫球蛋白的至少一部分恒定区或结构域。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利第5,225,539和5,639,641号中。

[0068] 术语“人抗体”是指由人产生的抗体,或使用本领域中已知的任何技术制备的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。术语“人抗体”包括完整(全长)抗体、其片段和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体,诸如包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0069] “拮抗剂”、“阻断”或“中和”结合蛋白是抑制或降低它所结合的抗原诸如ALK7的活性的结合蛋白。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白降低或抑制ALK7和ActRII受体(例如ActRIIA或ActRIIB)、GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和/或Nodal的多聚化。在某些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白大致上或完全抑制ALK7的活性。在一些实施方案中,ALK7活性降低10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或100%。在某些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体,诸如全长抗体或ALK7结合抗体片段。在其他实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体使ALK7的活性抑制或降低至少10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0070] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单一结合位点与它的结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力可通常由解离常数(K_D)表示。亲和力可通过本领域中已知的常见方法,包括本文所述的那些来测量,并且可出于本公开的目的来使用。

[0071] “效能”是化合物的药理学活性的量度,其以所述化合物的为产生给定强度的作用所需的量表示。它是指化合物的为实现确定生物作用所需的量;所需剂量越小,药物越强力。除非另外陈述,否则效能通常表示为以nM计的 IC_{50} 值。 IC_{50} 是ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)的中值抑制浓度。在功能性测定中, IC_{50} 是使生物应答降低它的最大值的50%的浓度。在配体-受体结合研究中, IC_{50} 是使配体-受体结合降低最大特异性结合水平的50%的浓度。可通过本领域中已知的许多手段计算 IC_{50} 。本文提供的抗体或其他结合蛋白相较于参考抗ALK7抗体或其他ALK7结合蛋白的效能倍数改善可为至少2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、20倍、30

倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、160倍、170倍或至少180倍。

[0072] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种形式的细胞毒性，其中结合于某些细胞毒性细胞（例如天然杀伤（NK）细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）上存在的Fc受体（FcR）上的分泌型Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞，并且随后用细胞毒素杀灭所述靶细胞。针对靶细胞的表面的特异性高亲和力IgG抗体“武装”细胞毒性细胞，并且绝对地为这种杀灭所需。对靶细胞的溶解处于细胞外，需要直接细胞与细胞接触，并且不涉及补体。可以预期的是，除抗体之外，能够特异性结合携带ALK7的靶细胞的包含Fc区的其他蛋白质，特别是Fc融合蛋白，将能够实现细胞介导的细胞毒性。为简单起见，由Fc融合蛋白的活性所致的细胞介导的细胞毒性在本文中也称为ADCC活性。

[0073] “经分离”ALK7结合蛋白（例如ALK7抗体，包括其ALK7结合片段、变体和衍生物）、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈不见于自然界中的形式的蛋白质（例如抗体）、多核苷酸、载体、细胞或组合物。经分离蛋白质、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已在它们不再呈它们见于自然界中所处的形式的程度上被纯化的那些。在一些实施方案中，经分离蛋白质、多核苷酸、载体、细胞或组合物是大致上纯净的。经分离蛋白质和经分离核酸将不含或大致上不含它们天然地与其相伴的物质，诸如它们与其一起见于它们的天然环境中，或当通过在体外或在体内实践的重组DNA技术制备时见于对它们进行这种制备所处的环境（例如细胞培养）中的其他多肽或核酸。蛋白质和核酸可与稀释剂或佐剂一起配制并且出于实际目的仍然是经分离的 - 例如如果用于包被微量滴定板以在免疫测定中使用，那么将通常使蛋白质与明胶或其他载体混合，或当用于诊断或治疗中时，将使蛋白质与药学上可接受的载体或稀释剂混合。

[0074] 术语“受试者”、“个体”、“动物”、“患者”和“哺乳动物”是指需要诊断、预后或治疗的任何受试者，特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括但不限于将是特定治疗的接受者的人、非人灵长类动物、家养动物、农场动物、啮齿动物等。

[0075] 术语“药物组合物”是指以下制剂：所述制剂呈使得容许活性成分的生物活性有效的形式，并且不含有处于对组合物所将施用的受试者具有不可接受的毒性的浓度下的额外组分。此组合物可为无菌的。

[0076] 如本文公开的多肽例如包括抗体的抗原结合蛋白的“有效量”是足以实现具体陈述的目的的量。“有效量”可关于陈述的目的凭经验以及以常规方式确定。术语“治疗有效量”是指多肽例如包括抗体的抗原结合蛋白或其他药物的有效“治疗”受试者（例如哺乳动物诸如人）中的疾病或疾患的量，并且对患有所述疾病或疾患的受试者提供一定改善或益处。因此，“治疗有效”量是在ALK7介导的疾病或疾患的至少一种临床症状方面提供一定缓和、缓解和/或减轻的量。与可通过本公开方法治疗的疾病或疾患相关的临床症状是熟知的。此外，治疗作用无需是完全的或治愈性的，只要对受试者提供一定益处即可。在一些实施方案中，术语“治疗有效”是指治疗剂的能够降低有需要的受试者中的ALK7活性的量。实际施用量以及施用速率和时程将取决于所治疗对象的性质和严重性。开具治疗处方例如决定剂量等属于全科医师和其他医师的职责。抗体及其抗原结合片段的适当剂量是普遍已知的；参见Ledermann等人，*Int. J. Cancer* 47:659-664 (1991)；Bagshawe等人，*Ant. Immun. and Radiopharm.* 4:915-922 (1991)。

[0077] “足量”或“足以在患有ALK7介导的疾病或疾患的受试者中实现特定结果的量”是指治疗剂(例如如本文公开的抗原结合蛋白,包括抗体)的有效产生所需作用的量,所述所需作用任选地是治疗作用(即通过施用治疗有效量达成)。在一些实施方案中,此特定结果是有需要的受试者中的ALK7活性降低。

[0078] 术语“标记”是指直接或间接缀合于诸如抗ALK7抗体的部分以便产生“经标记”部分的可检测化合物或组合物。标记本身可为可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或在酶标记的情况下,可催化底物化合物或组合物的可检测化学改变。

[0079] 诸如“治疗(treating/treatment)”、“用以治疗”或“改善”和“用以改善”的术语是指(a)治愈、减缓、减轻所诊断病理性疾患或病症的症状以及/或者使所诊断病理性疾患或病症的进展停止的治疗性措施与(b)预防和/或减缓所靶向疾病或疾患的发展的防治性或预防性措施两者。因此,需要治疗的受试者包括已患有疾病或疾患的那些;处于显现疾病或疾患的风险下的那些;以及待预防疾病或疾患的那些。在某些实施方案中,如果受试者显示例如与疾病或疾患相关的症状的全部、部分或短暂改善或消除,那么所述受试者根据本文提供的方法得到了成功“治疗”。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗选自以下的疾病、病症或疾患的方法:肥胖(例如腹部肥胖);胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和癌症(例如骨髓瘤(多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢(例如上皮卵巢)癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌);以及与以上疾病或疾患中的一者或多者或与超重(例如 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI)或与体脂过多相关的其他病症/疾患。

[0080] 如本文所用,“与……组合”或“组合疗法”是指使得额外疗法(例如第二、第三、第四疗法等)在身体中仍然有效的任何施用形式(例如多种化合物在受试者中同时有效,此可包括那些化合物的协同作用)。有效性可不与剂在血液、血清或血浆中的可测量浓度相关联。举例来说,不同治疗性化合物可于同一制剂中或于单独制剂中,并行或依序以及根据不同时程加以施用。因此,接受此治疗的受试者可受益于不同疗法的组合作用。一种或多种本文提供的ALK7结合蛋白可与一种或多种其他额外剂和/或支持性疗法并行,在其之前,或在其之后加以施用。一般来说,每种治疗剂将在对于那个特定药剂确定的剂量下以及/或者根据对于那个特定药剂确定的时间进程加以施用。待在方案中采用的特定组合将考虑本公开的拮抗剂与疗法和/或所需结果的相容性。

[0081] 除非另外指示,否则本公开的方法和技术通常根据已知常规方法以及如在整篇本公开中引用和讨论的各种一般性和更具体参考文献中所述来进行。参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2001)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates(1992),以及Harlow和Lane

Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 其全部通过引用并入本文。

[0082] 术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性”和“恶性”是指或描述哺乳动物中的特征通常在于细胞生长不受调控的生理状况。癌症的实例包括但不限于包括腺癌的上皮癌、淋巴瘤、母细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更特定实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、霍奇金氏 (Hodgkin's) 和非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝脏癌症诸如肝癌和肝细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌 (包括激素介导的乳腺癌, 参见例如 Innes 等人, Br. J. Cancer 94:1057-1065 (2006))、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、骨髓瘤 (诸如多发性骨髓瘤)、唾液腺癌、肾癌诸如肾细胞癌和韦尔姆斯氏肿瘤 (Wilms' tumor)、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、阴门癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌、各种类型的头颈部癌和粘液来源的癌症诸如粘液卵巢癌、胆管癌 (肝) 和肾乳头状癌。在特定实施方案中, 癌症是乳腺癌、子宫内膜癌或子宫癌。在其他实施方案中, 癌症是骨髓瘤 (例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤和髓外骨髓瘤)、或子宫内膜癌、胃癌、肝癌、结肠癌、肾癌或胰腺癌。

[0083] 术语“多核苷酸”和“核酸”可互换使用, 并且意图涵盖单一核酸以及多个核酸, 并且是指经分离核酸分子或构建体, 例如信使RNA (mRNA)、互补性DNA (cDNA) 或质粒DNA (pDNA)。在某些实施方案中, 多核苷酸包含常规磷酸二酯键或非常规键 (例如酰胺键, 诸如见于肽核酸 (PNA) 中)。术语“核酸”是指存在于多核苷酸中的任何一个或多个核酸区段, 例如DNA、cDNA或RNA片段。当应用于核酸或多核苷酸时, 术语“经分离”是指核酸分子、DNA或RNA已从它的天然环境移除, 例如出于本公开的目的, 载体中含有的编码抗原结合蛋白的重组多核苷酸被视为是经分离的。经分离多核苷酸的其他实例包括维持在异源性宿主细胞中或处于溶液中的从其他多核苷酸纯化 (部分或大致上) 的重组多核苷酸。经分离RNA分子包括本公开的多核苷酸的体内或体外RNA转录物。本公开的经分离多核苷酸或核酸还包括合成产生的此类分子。此外, 多核苷酸或核酸可包括调控元件, 诸如启动子、增强子、核糖体结合位点或转录终止信号。

[0084] 术语“载体”意指能够将一个或多个目标基因或序列递送在宿主细胞中, 并且在一些实施方案中, 能够在宿主细胞中表达一个或多个目标基因或序列的构建体。表示表达载体包围在缩合剂周围, 便于递送至细胞中载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缔合的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体, 以及某些真核细胞诸如生产细胞。

[0085] 术语“宿主细胞”是指具有或能够具有重组核酸的细胞或细胞群体。宿主细胞可为原核的 (例如大肠杆菌 (*E. coli*)) 或真核的。宿主细胞可为真菌细胞, 包括酵母, 诸如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 或粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)。宿主细胞还可为各种动物细胞中的任一者, 诸如昆虫细胞 (例如 Sf-9) 或哺乳动物细胞 (例如 HEK293F、CHO、COS-7、NIH-3T3、NS0、**PER.C6®** 和杂交瘤)。在其他实施方案中, 宿主细胞是选自以下的CHO细胞: CHO-K、CHO-0、CHO-Lec10、CHO-Lec13、CHO-Lec1、CHO Pro⁻5 和 CHO dhfr⁻。在特定实施方案中, 宿主细胞是杂交瘤。

[0086] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换用于指代任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可为线性的或分支的, 它可包含经修饰氨基酸, 并且它可间插有非氨基酸。所述

术语还涵盖已天然地或通过干预加以修饰的氨基酸聚合物；例如形成二硫键、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰诸如与标记组分缀合。还包括在定义内的是例如含有一个或多个氨基酸类似物（包括例如非天然氨基酸等）以及本领域中已知的其他修饰的多肽。应了解，因为在一些实施方案中，提供的ALK7结合蛋白基于抗体，所以ALK7结合蛋白可以单链或缔合链形式存在。

[0087] “重组”多肽、蛋白质或抗体是指通过重组DNA技术产生的多肽、蛋白质或抗体。出于本公开的目的，在宿主细胞中表达的重组产生的多肽、蛋白质和抗体被视为是经分离的，已通过任何适合技术来分离、分级分离或部分或大致上纯化的天然或重组多肽也被视为是经分离的。

[0088] 还包括在本公开中的是多肽的片段、变体或衍生物，以及它们的任何组合。当涉及多肽和蛋白质时，术语“片段”包括保留参考多肽或蛋白质的至少一些性质的任何多肽或蛋白质。多肽的片段包括蛋白水解片段以及缺失片段。

[0089] 术语“变体”是指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本抗体或多肽序列的抗体或多肽序列。抗体或多肽的变体包括片段，并且还包括由于氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的抗体或多肽。变体可为天然存在的或非天然存在的。可使用任何适合诱变技术产生非天然存在的变体。变异多肽可包含保守性或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。

[0090] 如应用于抗体或多肽的术语“衍生物”是指已被改变以便展现不见于天然抗体或多肽的情况下的额外特征的抗体或多肽。“衍生”抗体的一实例是与第二多肽或另一分子（例如聚合物诸如PEG、发色团或荧光团）或原子（例如放射性同位素）的融合物或缀合物。

[0091] 术语“氨基酸取代”是指用另一氨基酸残基替换亲本序列中存在的氨基酸残基。可例如通过化学肽合成或通过已知重组方法来取代亲本序列中的氨基酸。因此，提及“在位置X处取代”或“在位置X处取代”是指用替代性氨基酸残基取代存在于位置X处的氨基酸残基。在一些实施方案中，取代样式可根据模式AXY来描述，其中A是对应于天然存在于位置X处的氨基酸残基的单字母代码，并且Y是取代性氨基酸残基。在其他实施方案中，取代样式可根据模式XY来描述，其中Y是对应于取代天然存在于位置X处的氨基酸残基的氨基酸残基的单字母代码。

[0092] “保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。先前已定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族，包括碱性侧链（例如Lys、Arg、His）、酸性侧链（例如Asp、Glu）、不带电荷极性侧链（例如Gly、Asp、Gln、Ser、Thr、Tyr、Cys）、非极性侧链（例如Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、Trp）、 β -分支侧链（例如Thr、Val、Ile）和芳族侧链（例如Tyr、Phe、Trp、His）。因此，如果多肽中的氨基酸残基被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替换，那么取代被视为是保守性的。或者，一串氨基酸残基可被在侧链家族成员的顺序和/或组成方面不同的在结构上类似的串段保守替换。

[0093] 非保守性取代包括以下那些取代：其中（a）具有电正性侧链的残基（例如Arg、His或Lys）被取代成电负性残基（例如Glu或Asp）或由所述电负性残基取代，（b）亲水性残基（例如Ser或Thr）被取代成疏水性残基（例如Ala、Leu、Ile、Phe或Val）或由所述疏水性残基取代，（c）Cys或Pro被取代成任何其他残基或由任何其他残基取代，或（d）具有庞大疏水性或芳族侧链的残基（例如Val、His、Ile或Trp）被取代成具有较小侧链的残基（例如Ala或Ser）

或无侧链残基(例如Gly)或由所述具有较小侧链的残基或无侧链残基取代。

[0094] 可容易地鉴定其他取代。举例来说,对于氨基酸丙氨酸,取代可取自D-Ala、Gly、 β -Ala、L-Cys和D-Cys中的任一者。对于赖氨酸,替换可为D-Lys、Arg、D-Arg、高Arg、Met、D-Met、鸟氨酸或D-鸟氨酸中的任一者。通常,在功能重要区域中的可被预期会诱导经分离多肽的性质变化的取代是以下那些取代:其中(a)极性残基(例如Ser或Thr)被取代成疏水性残基(例如Leu、Ile、Phe或Ala)(或由所述疏水性残基取代);(b)Cys残基被取代成任何其他残基(或由任何其他残基取代);(c)具有电正性侧链的残基(例如Lys、Arg或His)被取代成具有电负性侧链的残基(例如Glu或Asp)(或由所述具有电负性侧链的残基取代);或(d)具有庞大侧链的残基(例如Phe)被取代成不具有此种侧链的残基(例如Gly)(或由所述不具有此种侧链的残基取代)。前述非保守性取代中的一者可改变蛋白质的功能性质的可能性还与相对于蛋白质的功能重要区域的取代位置相关联:因此,一些非保守性取代可对生物性质具有少许或不具有影响。

[0095] 术语“氨基酸插入”是指在存在于亲本序列中的两个氨基酸残基之间引入新的氨基酸残基。可例如通过化学肽合成或通过本领域中已知的重组方法来将氨基酸残基插入亲本序列中。因此,短语“在位置X与Y之间插入”或“在Kabat位置X与Y之间插入”,其中X和Y对应于氨基酸残基位置(例如在位置239与240之间插入半胱氨酸氨基酸残基),是指在X位置与Y位置之间插入氨基酸残基,并且还指在核酸序列中在编码在位置X和Y处的氨基酸残基的密码子之间插入编码氨基酸残基的密码子。

[0096] 两个多核苷酸或多肽序列之间的术语“序列同一性百分比”或“同一性百分比”是指在考虑必须被引入以达成两个序列的最优比对的添加或缺失(即空位)的情况下,历经比较窗,由序列共有的相同匹配位置的数目。匹配位置是相同核苷酸或氨基酸呈现于靶标序列与参考序列两者中所处的任何位置。不对呈现于靶标序列中的空位计数,因为空位不是核苷酸或氨基酸。同样,不对呈现于参考序列中的空位计数,因为计数的是靶标序列核苷酸或氨基酸,而非来自参考序列的核苷酸或氨基酸。通过以下方式计算序列同一性百分比:确定相同氨基酸残基或核酸碱基存在于两个序列中所处的位置的数目以产生匹配位置的数目,用匹配位置的数目除以比较窗中的位置总数,以及用100乘以结果以产生序列同一性百分比。可使用可易于获得的软件程序实现序列的比较以及对两个序列之间的序列同一性百分比的确定。适合软件程序可从各种来源获得,并且可用于比对蛋白质序列与核苷酸序列两者。一种适于确定序列同一性百分比的程序是bl2seq,其是从美国政府的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)BLAST网站(blast.ncbi.nlm.nih.gov)获得的BLAST程序套件的一部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。其他适合程序是例如Needle、Stretcher、Water或Matcher,其是EMBOSS生物信息学程序套件的一部分,并且也可从欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute, EBI)在www.ebi.ac.uk/Tools/psa处获得。

[0097] 用于携带一个CDR或一组CDR的结构将通常是抗体重链或轻链序列或其实质性部分,其中这个CDR或这组CDR位于对应于由重排的免疫球蛋白基因编码的天然存在的VH和VL抗体可变结构域的CDR或一组CDR的位置处。免疫球蛋白可变结构域和它们的CDR的结构和位置可容易地由本领域技术人员使用程序和已知可变结构域残基编号系统诸如Chothia、

Chothia+和Kabat来确定,可常规地通过参考Kabat (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第4版. U.S. DHHS. 1987, 以及可在因特网上 (例如在 bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.html; 以及 immuno.bme.nwu.edu处) 获得的工具) 来确定, 所述参考文献通过引用以它的整体并入本文。

[0098] CDR还可由其他骨架携带, 诸如纤连蛋白 (fibronectin)、细胞色素B、白蛋白 (例如 ALBUdAb (Domantis/GSK) 和 ALB-Kunitz (Dyax))、3或6个氨基酸的非结构化重复序列 (例如 **PASylation®** 技术和 **XTEN®** 技术), 以及含有弹性蛋白 (elastin) 样重复结构域的序列 (参见例如美国专利申请第61/442,106号, 其通过引用以它的整体并入本文)。

[0099] 大致上如本文阐述的CDR氨基酸序列可作为CDR携带于人可变结构域或其实质性部分中。大致上如本文阐述的HCDR3序列代表本公开的实施方案, 并且这些HCDR3序列中的每一者可作为HCDR3携带于人重链可变结构域或其实质性部分中。

[0100] 本公开中采用的可变结构域可从任何种系或重排的人可变结构域获得, 或可为基于已知人可变结构域的共有序列的合成可变结构域。可使用重组DNA技术将CDR序列 (例如 CDR3) 引入至缺乏CDR (例如CDR3) 的可变结构域的谱系中。

[0101] 举例来说, Marks等人 (Bio/Technology 10:779-783 (1992); 其通过引用以它的整体并入本文) 提供了产生抗体可变结构域的谱系的方法, 其中对准在或邻近于可变结构域区域的5'末端的共有引物与人VH基因的第三框架区的共有引物联合用于提供缺乏CDR3的VH可变结构域的谱系。Marks等人还描述了这个谱系可如何与特定抗体的CDR3组合。使用类似技术, 可用缺乏CDR3的VH结构域或VL结构域的谱系改组本公开的CDR3源性序列, 并且使经改组完全VH结构域或VL结构域与同源VL结构域或VH结构域组合以提供抗原结合蛋白。可接着在适合宿主系统中展示谱系, 所述适合宿主系统诸如是国际申请公布第W092/01047号或包括Kay等人, (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press的后续大量文献中的任一者的噬菌体展示系统, 以致可选择适合抗原结合蛋白。谱系可由104个以上的任何数目的单个成员, 例如 10^6 至 10^8 个, 或 10^{10} 个成员组成。其他适合宿主系统包括酵母展示、细菌展示、T7展示和核糖体展示。对于核糖体展示的综述, 参见Lowe等人, Curr. Pharm. Biotech. 517-527 (2004) 以及国际申请公布第W092/01047号, 其各自通过引用以它的整体并入本文。类似改组或组合技术还由Stemmer (Nature 370:389-391 (1994), 其通过引用以它的整体并入本文) 公开, 其描述关于 β -内酰胺酶基因的技术, 但观察到所述方法可用于产生抗体。

[0102] 术语“抗原结合区”或“ABR”是指互补位, 其是抗体内识别和结合抗原 (Ag) 的残基。ABR或一组ABR将通常是抗体重链或轻链序列或其实质性部分, 其中所述ABR或一组ABR位于对应于由重排的免疫球蛋白基因编码的天然存在的VH和VL抗体可变结构域的ABR或一组ABR的位置处。免疫球蛋白可变结构域和它们的ABR的结构和位置可容易地由本领域技术人员使用程序以及已知可变结构域残基编号系统和可在因特网上获得的工具 (例如Kunik V. 等人, Nucleic Acids Res. 2012年7月; 40) 来确定, 所述参考文献通过引用以它的整体并入本文。

[0103] 如果ALK7结合蛋白 (例如抗ALK7抗体) 结合ALK7达到它在某种程度上阻断参考分子与ALK7的结合的程度, 那么它被称为与所述参考分子“竞争”结合ALK7。可通过本领域中

已知的任何标准竞争性结合测定,包括例如竞争ELISA测定、表面等离子体共振 (SPR; **BIACORE®**, Biosensor, Piscataway, N.J.), 或根据由 Scatchard 等人 (Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660-672 (1949)) 所述的方法来测定蛋白质竞争结合ALK7,因此干扰、阻断或“交叉阻断”彼此与ALK7的结合的能力。ALK7结合蛋白可被称为以竞争性方式使参考分子与ALK7的结合抑制例如至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。根据一些实施方案,ALK7结合蛋白以竞争性方式使参考分子与ALK7的结合抑制至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。根据其他实施方案,ALK7结合蛋白以竞争性方式使参考分子与ALK7的结合抑制至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0104] ALK7结合蛋白

[0105] 提供了特异性结合ALK7的蛋白质。在一些实施方案中,提供了拮抗剂ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是抗体。在其他实施方案中,抗体是拮抗剂抗ALK7抗体。

[0106] 如本文所用,术语“ALK7”是指来自任何物种的活化素受体样激酶-7蛋白的家族以及通过诱变或其他修饰而源于此类ALK7蛋白的变体。在本文中提及ALK7应理解为提及当前鉴定的形式中的任一者。ALK7家族的成员通常是跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸的区域的配体结合细胞外结构域、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。存在人ALK7的各种天然存在的同工型。典型人ALK7同工型1前体蛋白的序列 (NCBI参考序列NP_660302.2) 如下:

```
1 MTRALCSALR QALLLLAAAA ELSPGLKCVC LLCSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI
61 KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAKLG PMELAIITV
121 PVCLLSIAAM LTVWACQGRQ CSYRKKRPN VEEPLSECNL VNAGKTLKDL IYDVTSAGSG
181 SGLPLLQRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA VKIFSSRDER SWFREAEIYQ
```

[0107]

```
241 TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD YLNRNIVTVA GMIKLALSIA
301 SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDIKSKNIL VKKCETCAIA DLGLAVKHDS ILNTIDIPQN
361 PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD IYSVGLVYWE IARRCSVGGI VEEYQLPYD
421 MVPSDPSIEE MRKVCDQKF RPSIPNQWQS CEALRVMGRI MRECWYANGA ARLTALRIKK
```

481 TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 85) 信号肽由单下划线指示,并且细胞外结构域以粗体字体指示。

[0108] 典型大鼠ALK7前体蛋白的序列 (NCBI参考序列P70539.1) 如下:

```
1 MTPARRSALS LALLLVALAS DLAAGLKVC LLCSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVS
61 KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITQHLP TASPDAKLG PTELTVVITV
121 PVCLLSIAAM LTIWACQDRQ CTYRKTNRHN VEEPLAEYSL VNAGKTLKDL IYDATASGSG
181 SGPPLLQRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA VKIFSSRDER SWFREAEIYQ
```

[0109]

```
241 TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD YLNRNIVTVA GMVKLALSIA
301 SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDIKSKNIL VKKCDTCAIA DLGLAVKHDS IMNTIDIPQN
361 PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD IYSVGLVYWE IARRCSVGGI VEEYQLPYD
421 MVPSDPSIEE MRKVCDQKL RPNLPNQWQS CEALRVMGRI MRECWYANGA ARLTALRVKK
```

481 TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 86) 信号肽由单下划线指示,并且细胞外结构域以粗体字体指示。

[0110] 在一些实施方案中,相比于ALK7结合蛋白对不是TGF- β 受体家族成员的对照蛋白质的亲和力,ALK7结合蛋白以至少100、500或1000倍大的亲和力结合ALK7。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白结合ALK7,并且具有 $<1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<10\text{pM}$ 、 $<1\text{pM}$ 或 $<0.1\text{pM}$ 的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白对人ALK7具有在 $\leq 1\mu\text{M}$ 且 $\geq 0.1\text{pM}$, $\leq 100\mu\text{M}$ 且 $\geq 0.1\text{pM}$,或 $\leq 100\mu\text{M}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的范围内的 K_D 。

[0111] 在一些实施方案中,BIACORE®分析用于测定ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)与参考ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)竞争结合ALK7蛋白/阻断由参考ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)对ALK7蛋白的结合的能力。在其中根据制造商推荐操作BIACORE®仪器(例如BIACORE®3000)的其他实施方案中,通过先前附接的抗niFc IgG来将ALK7-Fc融合蛋白捕集在CM5 BIACORE®芯片上以产生经ALK7包被表面。通常,将使200-800共振单位的ALK7-Fc(二聚)偶联于芯片(即产生可易于测量的结合水平,但可易于由所使用的各种浓度的测试试剂饱和的数量)。

[0112] 在一比一的结合位点摩尔比下在适合缓冲液中混合待评估它们彼此竞争/阻断的能力的两种ALK7结合蛋白(被称为A*和B*)以产生测试混合物。当基于结合位点计算浓度时,ALK7结合蛋白的分子量被假定为ALK7结合蛋白的总分子量除以那个ALK7结合蛋白上的ALK7结合位点的数目。测试混合物中的每种ALK7结合蛋白(即A*和B*)的浓度应足够高以容易地使捕集在BIACORE®芯片上的ALK7-Fc分子上的关于那个ALK7结合蛋白的结合位点饱和。混合物中的A*和B*ALK7结合蛋白在相同摩尔浓度(基于结合)下,并且那个浓度将通常在1.00与1.5微体积摩尔浓度(基于结合位点)之间。还制备含有单独ALK7结合蛋白A*和单独ALK7结合蛋白B*的单独溶液。这些溶液中的ALK7结合蛋白A*和ALK7结合蛋白B*应在与测试混合物中相同的缓冲液中以及在相同浓度下。使测试混合物穿过经ALK7-Fc包被的BIACORE®芯片,并且记录总结合量。接着以移除结合的ALK7结合蛋白而不损害芯片结合的ALK7-Fc的方式处理芯片。通常,这通过用30mM HCl处理芯片60秒来进行。接着使单独ALK7结合蛋白A*的溶液穿过经ALK7-Fc包被的表面,并且记录结合量。再次处理芯片以移除结合的抗体,而不损害芯片结合的ALK7-Fc。接着使单独ALK7结合蛋白B*的溶液穿过经ALK7-Fc包被的表面,并且记录结合量。接着计算ALK7结合蛋白A*和ALK7结合蛋白B*的混合物的最大理论结合,并且是每种ALK7结合蛋白在单独穿过ALK7表面时的结合的总和。如果混合物的实际记录结合小于这个理论最大值,那么两种ALK7结合蛋白彼此竞争/阻断。因此,一般来说,阻断性ALK7结合蛋白是以下ALK7结合蛋白:其将在以上BIACORE®阻断测定中结合ALK7,以致在测定期间以及在第二ALK7结合蛋白存在下,记录的结合在呈组合形式的两种ALK7结合蛋白的最大理论结合的80%与0.1%之间(例如80%至4%),特别是在最大理论结合的75%与0.1%之间(例如75%至4%),并且更特别是在最大理论结合(如上所定义)的70%与0.1%之间(例如70%至4%)。

[0113] 上述BIACORE®测定是用于确定两种ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体是否彼此竞争/阻断结合ALK7的示例性测定。偶尔,特定ALK7结合蛋白可能不结合通过抗Fc IgG偶联于CM5 BIACORE®芯片的ALK7-Fc(这可能在ALK7上的相关结合位点由于ALK7连接于Fc而被掩蔽或破坏时发生)。在此类情况下,可使用ALK7的标签化形式例如C末端His标签化ALK7来确定阻断。在这个特定形式中,将使抗His抗体偶联于BIACORE®芯片,接着将使

His标签化ALK7穿过芯片的表面,并且由所述抗His抗体捕集。将基本上如上所述进行交叉阻断分析,例外之处是在每个芯片再生循环之后,新的His标签化ALK7将被装载回用抗His抗体包被的表面上。此外,各种其他已知标签和标签结合蛋白组合可用于此种阻断分析(例如HA标签与抗HA抗体;FLAG标签与抗FLAG抗体;生物素标签与链霉亲和素)。以下一般地描述用于确定ALK7结合蛋白是否阻断或能够阻断参考ALK7结合蛋白与ALK7的结合的ELISA测定。

[0114] 在一些实施方案中,ELISA用于测定ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)与参考ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体或ALK7配体)竞争结合ALK7的能力。此种测定的一般原理在于使参考ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)包被于ELISA板的孔上。添加处于溶液中(即不结合于ELISA板)的过量第二潜在阻断性测试ALK7结合蛋白。接着将有限量的ALK7(或者ALK7-Fc)添加至孔中。包被的参考ALK7结合蛋白和处于溶液中的测试ALK7结合蛋白竞争结合有限数目的ALK7(或ALK7-Fc)分子。将板洗涤以移除尚未由包被的参考ALK7结合蛋白结合的ALK7,并且也移除测试溶液相ALK7结合蛋白以及在测试溶液相ALK7结合蛋白与ALK7之间形成的任何复合物。接着使用适当ALK7检测试剂测量结合的ALK7的量。溶液中的能够阻断包被的参考ALK7结合蛋白与ALK7的结合的测试ALK7结合蛋白将能够导致包被的参考ALK7结合蛋白可结合的ALK7分子的数目相对于包被的参考ALK7结合蛋白可在不存在第二溶液相测试ALK7结合蛋白下结合的ALK7分子的数目得到降低。测定的背景信号定义为在具有包被的参考ALK7结合蛋白、溶液相测试ALK7结合蛋白、仅ALK7缓冲液(即无ALK7)和ALK7检测试剂的孔中获得的信号。测定的阳性对照信号定义为在具有包被的参考ALK7结合蛋白、仅溶液相测试ALK7结合蛋白缓冲液(即无溶液相测试ALK7结合蛋白)、ALK7和ActRII受体(例如ActRIIA或ActRIIB)检测试剂的孔中获得的信号。ELISA测定以此种方式运行以便具有是背景信号的至少3倍的阳性对照信号。作为方法学假象的对照,交叉阻断测定可以刚才描述并且还加以逆转的形式运行,其中测试ALK7结合蛋白作为包被的抗体,并且参考ALK7结合蛋白作为溶液相抗体。

[0115] 在一些实施方案中,相比于ALK7结合蛋白对不是TGF- β 受体家族成员的对照蛋白质的亲和力,ALK7结合蛋白以至少100、500或1000倍大的亲和力结合ALK7。在额外实施方案中,相比于ALK7结合蛋白对不是TGF- β 受体家族成员的对照蛋白质的亲和力,ALK7结合蛋白以至少100、500或1000倍大的亲和力结合ALK7。在某些实施方案中,ALK7结合蛋白结合ALK7,并且具有 $<1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<10\text{pM}$ 、 $<1\text{pM}$ 或 $<0.1\text{pM}$ 的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白对人ALK7具有在 $\leq 1\mu\text{M}$ 且 $\geq 0.1\text{pM}$, $\leq 100\mu\text{M}$ 且 $\geq 0.1\text{pM}$,或 $\leq 100\mu\text{M}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的范围内的 K_d 。

[0116] 在一些实施方案中,基于细胞的脂解抑制测定用于测定ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗ALK7抗体)降低(抑制)哺乳动物白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制的能力。在一些实施方案中,使用成熟白色脂肪细胞(例如人、小鼠或大鼠)进行脂解抑制测定以测定ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)降低ALK7活性的能力。用于进行脂解测定的试剂盒、试剂和方法可商购获得,并且在本领域中是已知的。在特定实施方案中,如本文实施例中所提供来进行脂解抑制测定。在其他实施方案中,根据如可商购获得的脂解测定试剂盒(例如BioAssay Systems, EnzyChrom™脂肪水解测定试剂盒,目录号EAPL-200;Abcam目录号ab185433;Zen-Bio,目录号LIP-1-NCL1;BioVision,目录号K577-100;Sigma-Aldrich,目录号MAK211;以及

AdipoLyze™脂解检测测定, Lonza, 目录号193339) 中提供的说明书和试剂进行测定。

[0117] 在一些实施方案中, ALK7结合蛋白(一种ALK7结合蛋白)是ALK7拮抗剂, 并且使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中, ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中, ALK7结合蛋白使成熟白色脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至65%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%, 如在活化素B (50ng/ml) 存在下进行的脂解抑制测定中使用标准技术和条件所测定(例如如本文实施例中所述)。在其他实施方案中, ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中, ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中, ALK7结合蛋白使成熟白色脂肪细胞中的脂解增加至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%, 或约100%, 如在活化素B (50ng/ml) 存在下进行的脂解抑制测定中使用标准技术和条件所测定(例如如本文实施例中所述)。

[0118] 取决于ALK7信号传导的药效动力学参数可作为用以鉴定能够中和ALK7, 并且提供治疗益处的那些结合蛋白的体内ALK7结合蛋白测试的终点加以测量。ALK7中和结合剂定义为相较于媒介物处理的动物, 能够在此种药效动力学参数方面导致统计显著变化的结合剂。可在任何适合哺乳动物(例如小鼠、大鼠或猴)中进行此体内测试。

[0119] 在一些实施方案中, ALK7结合蛋白是特异性结合ALK7的抗体。在额外实施方案中, ALK7结合蛋白是全长抗ALK7抗体。在额外实施方案中, 抗体是单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、或它们的ALK7结合抗体片段。

[0120] 在一些实施方案中, 抗ALK7抗体是ALK7结合抗体片段。在一些实施方案中, ALK7结合抗体片段是: Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、微型双功能抗体或单链抗体分子。在额外实施方案中, ALK7抗体是Fd、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG Δ CH2、微型抗体、F(ab')₃、微型四功能抗体、微型三功能抗体、微型双功能抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb²、(scFv)₂、scFv-Fc或双scFv。

[0121] 在额外实施方案中, ALK7结合蛋白是包括VH和VL的抗体。在一些实施方案中, 抗ALK7抗体还包括重链恒定区或其片段。在一些实施方案中, 抗体包含选自以下的重链免疫球蛋白恒定区: (a) 人IgA恒定区或其片段; (b) 人IgD恒定区或其片段; (c) 人IgE恒定结构域或其片段; (d) 人IgG1恒定区或其片段; (e) 人IgG2恒定区或其片段; (f) 人IgG3恒定区或其片段; (g) 人IgG4恒定区或其片段; 和(h) 人IgM恒定区或其片段。在某些实施方案中, ALK7结合蛋白包含重链恒定区或其片段, 例如人IgG恒定区或其片段。在其他实施方案中, ALK7结合蛋白包含具有或已被突变来具有改变的效应子功能和/或半衰期的重链免疫球蛋白恒定结构域。

[0122] 在特定实施方案中, ALK7结合蛋白是包含含有降低效应子功能的突变的IgG1重链恒定区的抗体(参见例如Idusogie等人, J. Immunol. 166:2571-2575 (2001); Sazinsky等人, PNAS USA 105:20167-20172 (2008); Davis等人, J. Rheumatol. 34:2204-2210 (2007); Bolt等人, Eur. J. Immunol. 23:403-411 (1993); Alegre等人, Transplantation 57:1537-1543 (1994); Xu等人, Cell Immunol. 200:16-26 (2000); Cole等人, Transplantation 68:563-571 (1999); Hutchins等人, PNAS USA 92:11980-11984 (1995); Reddy等人, J. Immunol. 164:

1925-1933 (2000); W097/11971, and W007/106585; 美国申请公布2007/0148167A1; McEarchern等人, Blood 109:1185-1192 (2007); Strohl, Curr.Op.Biotechnol. 20:685-691 (2009); 以及Kumagai等人, J.Clin.Pharmacol. 47:1489-1497 (2007), 其各自通过引用以它的整体并入本文)。

[0123] 在一些实施方案中, 相对于野生型IgG恒定结构域, 重链恒定区或其片段包括一个或多个氨基酸取代, 其中相较于具有野生型IgG恒定结构域的IgG的半衰期, 经修饰IgG具有降低的ADCC。提供的抗体中含有的降低ADCC的Fc序列工程改造修饰的实例包括一个或多个对应于以下的修饰: IgG1-K326W、E333S; IgG2-E333S; IgG1-N297A; IgG1-L234A、L235A; IgG2-V234A、G237A; IgG4-L235A、G237A、E318A; IgG4-S228P、L236E; IgG2-EU序列118-260; IgG4-EU序列261-447; IgG2-H268Q、V309L、A330S、A331S; IgG1-C220S、C226S、C229S、P238S; IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A; 以及IgG1-L234F、L235E、P331S, 其中位置编号根据如Kabat中的EU索引。

[0124] 在某些实施方案中, ALK7结合蛋白包含具有或已被突变来具有降低的CDC活性的重链免疫球蛋白恒定结构域。在特定实施方案中, ALK7结合蛋白是包含含有降低CDC活性的突变的IgG1重链恒定区的抗体(参见例如W097/11971和W007/106585; 美国申请公布2007/0148167A1; McEarchern等人, Blood 109:1185-1192 (2007); Hayden-Ledbetter等人, Clin.Cancer 15:2739-2746 (2009); Lazar等人, PNAS USA 103:4005-4010 (2006); Bruckheimer等人, Neoplasia 11:509-517 (2009); Strohl, Curr.Op.Biotechnol. 20:685-691 (2009); 以及Sazinsky等人, PNAS USA 105:20167-20172 (2008); 其各自通过引用以它的整体并入本文)。抗ALK7抗体中含有的降低CDC的Fc序列工程改造修饰的实例包括一个或多个对应于以下的修饰: IgG1-S239D、A330L、I332E; IgG2 EU序列118-260; IgG4-EU序列261-447; IgG2-H268Q、V309L、A330S、A331S; IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A; IgG1-L234F、L235E、P331S; 以及IgG1-C226S、P230S。

[0125] 在其他实施方案中, 相对于野生型IgG恒定结构域, 重链恒定区或其片段包括一个或多个氨基酸取代, 其中相较于具有野生型IgG恒定结构域的IgG的半衰期, 经修饰IgG具有增加的半衰期。举例来说, IgG恒定结构域可含有在位置251-257、285-290、308-314、385-389和428-436处的氨基酸残基的一个或多个氨基酸取代, 其中氨基酸位置编号根据如Kabat中阐述的EU索引。在某些实施方案中, IgG恒定结构域可含有以下中的一者或多者: 在Kabat位置252处的氨基酸被Tyr、Phe、Trp或Thr取代; 在Kabat位置254处的氨基酸被Thr取代; 在Kabat位置256处的氨基酸被Ser、Arg、Gln、Glu、Asp或Thr取代; 在Kabat位置257处的氨基酸被Leu取代; 在Kabat位置309处的氨基酸被Pro取代; 在Kabat位置311处的氨基酸被Ser取代; 在Kabat位置428处的氨基酸被Thr、Leu、Phe或Ser取代; 在Kabat位置433处的氨基酸被Arg、Ser、Iso、Pro或Gln取代; 或在Kabat位置434处的氨基酸被Trp、Met、Ser、His、Phe或Tyr取代。更具体来说, 相对于野生型人IgG恒定结构域, IgG恒定结构域可含有氨基酸取代, 包括在Kabat位置252处的氨基酸被Tyr取代, 在Kabat位置254处的氨基酸被Thr取代, 以及在Kabat位置256处的氨基酸被Glu取代。

[0126] 在额外实施方案中, ALK7结合蛋白是包含轻链免疫球蛋白恒定区的抗体。在其他实施方案中, 抗体包含人Igκ恒定区或人Igλ恒定区。

[0127] 在一些实施方案中, ALK7结合蛋白包含一组互补决定区(CDR): 重链可变区(VH) -

CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、轻链可变区 (VL) -CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3,其中所述CDR存在于表1中公开的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 对中。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含存在于选自以下的VH和VL对中的一组CDR: (a) SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列; (b) SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列; (c) SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列;和 (d) SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列。

[0128] 在额外实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组CDR:VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3,其中所述组的CDR与参考组的CDR同一,或相对于所述参考组的CDR具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或少于十个氨基酸取代、缺失和/或插入,在所述参考组的CDR中: (a) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列; (b) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列; (c) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或 (d) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0129] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组CDR,其中: (a) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列; (b) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列; (c) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或 (d) (i) VH-CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列; (ii) VH-CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列; (iii) VH-CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列; (iv) VL-CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列; (v) VL-CDR2包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;并且 (vi) VL-CDR3包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0130] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含一组抗原结合区 (ABR):重链可变区 (VH) -ABR1、VH-ABR2、VH-ABR3、轻链可变区 (VL) -ABR1、VL-ABR2和VL-ABR3,其中所述ABR存在于表

1中公开的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 对中。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含存在于选自以下的VH和VL对中的一组ABR: (a) SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列; (b) SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列; (c) SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列;和 (d) SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列。

[0131] 在额外实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组ABR:VH-ABR1、VH-ABR2、VH-ABR3、VL-ABR1、VL-ABR2和VL-ABR3,其中所述组的ABR与参考组的ABR同一,或相对于所述参考组的ABR具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或少于十个氨基酸取代、缺失和/或插入,在所述参考组的ABR中: (a) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:74或69的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:75或70的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:77或88的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列; (c) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:80或93的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:81或94的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或 (d) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:83或98的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:84或99的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0132] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含一组abr,其中: (a) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:74或69的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:75或70的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:77或88的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列; (c) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:80或93的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:81或94的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;或 (d) (i) VH-ABR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列; (ii) VH-ABR2包含SEQ ID NO:83或98的氨基酸序列; (iii) VH-ABR3包含SEQ ID NO:84或99的氨基酸序列; (iv) VL-ABR1包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列; (v) VL-ABR2包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;并且 (vi) VL-ABR3包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0133] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且包含选自以下的VH和VL对: (a) (i) 与SEQ ID NO:4具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性

的VH,和(ii)与SEQ ID NO:13具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;(b) (i)与SEQ ID NO:22具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii)与SEQ ID NO:31具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;(c) (i)与SEQ ID NO:40具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii)与SEQ ID NO:49具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;以及(d) (i)与SEQ ID NO:58具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VH,和(ii)与SEQ ID NO:67具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的VL;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0134] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含选自以下的VH和VL对:(a) (i)相对于选自SEQ ID NO:4的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii)相对于SEQ ID NO:13的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;(b) (i)相对于SEQ ID NO:22的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii)相对于SEQ ID NO:31的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;(c) (i)相对于SEQ ID NO:40的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii)相对于SEQ ID NO:49的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;以及(d) (i)相对于SEQ ID NO:58的参考VH序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VH序列,和(ii)相对于SEQ ID NO:67的参考VL序列具有总计一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、少于十五个或零个氨基酸取代、缺失和/或插入的VL序列;并且其中所述蛋白结合ALK7。

[0135] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是特异性结合ALK7的抗体。在额外实施方案中,抗体是单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7结合抗体片段。在一些实施方案中,抗体是选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、微型双功能抗体、DART和单链抗体分子(例如BiTE)的抗体片段。

[0136] 在其他实施方案中,ALK7结合蛋白具有至少一种选自以下的特征:(a)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和II型受体的细胞的表面上,含有ALK7、所述II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成;(b)与一种或多种II型受体竞争结合ALK7;(c)与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7;(d)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化;(e)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化;(f)以 $\leq 1\text{nM}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的K_D(例如如通过

BIACORE®分析所测定)结合ALK7,以及(g)降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的2者、3者或4者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的至少2者、至少3者或至少4者。

[0137] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含至少一个突变、修饰和/或取代,例如Fc或Fab区中的突变。此类突变和/或取代可例如增加或改善ALK7结合蛋白表达水平、翻译后修饰、稳定性/半衰期和/或活性。在特定实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)在它的Fc区中包含至少一个突变、修饰和/或取代以例如在宿主中降低效应子活性和/或毒性,并且/或者降低补体结合和固定,降低Fc-g依赖性抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),降低补体依赖性细胞毒性(CDC),并且/或者改善生物利用度和/或稳定性/半衰期。

[0138] 其中的一者或多者可包括在提供的抗体中的降低ADCC的Fc序列工程改造修饰的实例包括对应于以下的修饰:IgG1-K326W、E333S;IgG2-E333S;IgG1-N297A;IgG1-L234A、L235A;IgG2-V234A、G237A;IgG4-L235A、G237A、E318A;IgG4-S228P、L236E;IgG2-EU序列118-260;IgG4-EU序列261-447;IgG2-H268Q、V309L、A330S、A331S;IgG1-C220S、C226S、C229S、P238S;IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A;以及IgG1-L234F、L235E、P331S,其中位置编号根据如Kabat中的EU索引。

[0139] 其中的一者或多者可包括在提供的抗体中的降低CDC活性的Fc序列工程改造修饰的实例包括例如W097/11971和W007/106585;美国申请公布2007/0148167A1;McEarchern等人,Blood 109:1185-1192(2007);Hayden-Ledbetter等人,Clin.Cancer 15:2739-2746(2009);Lazar等人,PNAS USA 103:4005-4010(2006);Bruckheimer等人,Neoplasia 11:509-517(2009);Strohl,Curr.Op.Biotechnol.20:685-691(2009);以及Sazinsky等人,PNAS USA 105:20167-20172(2008)中所述的一个或多个修饰,所述专利和文献中的每一者通过引用以它的整体并入本文。特定的此类修饰包括对应于以下的修饰:IgG1-S239D、A330L、I332E;IgG2 EU序列118-260;IgG4-EU序列261-447;IgG2-H268Q、V309L、A330S、A331S;IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A;IgG1-L234F、L235E、P331S;以及IgG1-C226S、P230S。

[0140] 其中的一者或多者可包括在提供的抗体中的改善半衰期的Fc序列工程改造修饰的实例包括在位置251-257、285-290、308-314、385-389和428-436处的氨基酸残基的取代,其中氨基酸位置编号根据如Kabat中阐述的EU索引。在某些实施方案中,IgG恒定结构域含有以下中的一者或多者:在Kabat位置252处的氨基酸被Tyr、Phe、Trp或Thr取代;在Kabat位置254处的氨基酸被Thr取代;在Kabat位置256处的氨基酸被Ser、Arg、Gln、Glu、Asp或Thr取代;在Kabat位置257处的氨基酸被Leu取代;在Kabat位置309处的氨基酸被Pro取代;在Kabat位置311处的氨基酸被Ser取代;在Kabat位置428处的氨基酸被Thr、Leu、Phe或Ser取

代;在Kabat位置433处的氨基酸被Arg、Ser、Iso、Pro或Gln取代;或在Kabat位置434处的氨基酸被Trp、Met、Ser、His、Phe或Tyr取代。更具体来说,相对于野生型人IgG恒定结构域,IgG恒定结构域可含有一个或多个氨基酸取代,包括在Kabat位置252处的氨基酸被Tyr取代,在Kabat位置254处的氨基酸被Thr取代,以及在Kabat位置256处的氨基酸被Glu取代。

[0141] 在一些实施方案中,本文所述的ALK7结合蛋白包含至少一个突变、修饰和/或取代,例如本文公开的Fc或Fab区中的用于降低ADCC和/或CDC效应以及/或者改善半衰期的突变。在其他实施方案中,本文所述的ALK7结合蛋白包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个取代,例如本文公开的Fc或Fab区中的突变。

[0142] 可将某一(一些)特定突变、修饰和/或取代单独或与至少一个上述突变、修饰和/或取代组合引入至本文所述的ALK7结合蛋白。举例来说,为降低抗体细胞毒性,可通过用丙氨酸、甘氨酸或天冬氨酸取代N₂₉₇来消除在残基N₂₉₇处的N连接的糖基化(Tao和Morrison (1989) J Immunol 143:2595-2601;Hristodorov等人(2013) Mol Biotechnol 54:1056-1068)。类似地,可修饰在位置299处的丝氨酸/苏氨酸残基(Sazinsky等人(2008) Proc Natl Acad Sci U S A 105:20167-20172)。在N₂₉₇处的突变可进一步与D₂₆₅A突变组合(Lund等人(1996) J Immunol 157:4963-4969),诸如指定为DANA(D₂₆₅A、N₂₉₇A)或DANG(D₂₆₅A、N₂₉₇G)的两对通常使用的氨基酸变化。用以缓和抗体效应子功能的替代性突变包括抗体下铰链中残基的取代,诸如L₂₃₄A和L₂₃₅A(LALA,Kabat位置)(Chappel等人(1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88:9036-9040)。这些残基形成CH2结构域上的Fc-γ受体结合位点的一部分,并且在具有较大或较小效应子功能的抗体同种型之间交换这些残基确认了它们在ADCC中的重要性。尽管在这些位点处的丙氨酸取代在人抗体与鼠抗体两者的情况下均有效降低ADCC,但这些取代降低CDC活性的有效性较小。通过用以定位Fc的C1q结合位点的随机诱变方法鉴定的另一单变体P₃₂₉A高度有效降低CDC活性,同时保留ADCC活性。已显示L₂₃₄A、L₂₃₅A和P₃₂₉A(LALA-PG,Kabat位置)取代的组合有效沉默人IgG1抗体的效应子功能。对于LALA、LALA-PG和其他突变的详细讨论,参见Lo等人(2017) J. Biol. Chem. 292:3900-3908,其内容据此通过引用以它们的整体并入本文。本文所述的ALK7结合蛋白可具有至少一个、两个、三个或更多个本文所述的突变。

[0143] 在某些优选实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)在重链(LALA HC)的Fc区中包含L₂₃₄A和L₂₃₅A突变(LALA,Kabat位置)。在其他优选实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)在重链的Fc区中包含L₂₃₄A、L₂₃₅A和P₃₂₉G突变(LALA-PG;Kabat位置)。

[0144] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是特异性结合ALK7的抗体。在一些实施方案中,抗ALK7抗体是鼠抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、多特异性抗体、或它们的任何组合。在一些实施方案中,抗ALK7抗体是Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段或sc(Fv)₂片段。

[0145] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且阻断ALK7配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B或Nodal)的活性。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且阻断共受体(例如cripto)的活性。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且降低与ALK7配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B或Nodal)的活性相关的脂肪形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白特异性结合ALK7,并且治疗或改善一种或多种与超重、肥胖或代谢病症相关的疾病或疾患。在一些实施方案中,疾病

或疾患是II型糖尿病。在一些实施方案中,疾病或疾患是高血压。在一些实施方案中,代谢病症是血脂异常、胰岛素抵抗、高胰岛素血症或高血糖症。

[0146] 在特定实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)降低ALK7介导的Smad信号传导。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色和/或棕色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制拮抗5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在脂解测定中所测定。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色和/或棕色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制降低或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如在脂解测定中所测定。在一些实施方案中,脂解测定在一种或多种ALK7配体存在下进行。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal的ALK7配体存在下进行。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白结合ALK7,并且抑制或减轻一种或多种与超重、肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、炎症和/或NAFLD(例如脂肪肝和/或NASH)相关的疾患。

[0147] 在特定实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)降低ALK7介导的Smad信号传导。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制抑制5%至100%、10%至95%、10至90%、10至85%、10至80%、10至75%、10至70%、10至75%、10至70%、10至60%、10至55%、10至50%、或10至45%,如在活化素B(50ng/ml)存在下进行的脂解抑制测定中使用标准技术和条件所测定(例如如本文实施例中所述)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使白色脂肪细胞中ALK7介导的脂解抑制降低或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,或约100%,如在活化素B(50ng/ml)存在下进行的脂解抑制测定中使用标准技术和条件所测定(例如如本文实施例中所述)。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白结合ALK7,并且抑制或减轻一种或多种与超重、肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、炎症和/或NAFLD(例如脂肪肝和/或NASH)相关的疾患。

[0148] 在某些实施方案中,由本文所述的ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)对ALK7的阻断会抑制或减轻一种或多种与体重超标、胰岛素抵抗、肥胖或糖尿病相关的疾患,诸如高血压、癌症和神经病变、视网膜病变以及心血管疾病、肺病和肾病。在其他实施方案中,对ALK7的阻断会抑制或减轻一种或多种与代谢疾病相关的疾患。在特定实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)抑制或降低由活化素B、GDF8或Nodal对ALK7的结合。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白抑制或降低通过Smad依赖性通路达成的脂解抑制。

[0149] 如上所指示,在一些实施方案中,含有结合ALK7的VH和/或VL氨基酸序列的抗ALK7抗体(例如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)可与本文阐述的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,相对于本文阐述的序列,结合ALK7的VH和/或VL氨基酸序列包含8、7、6、5、4、3、2、1个氨基酸添加、取代(例如保守性取代)或缺失。在额外实施方案中,相对于本文阐述的序列,结合ALK7的VH和/或VL氨基酸序列包含1、2、3、4、5个或更多个氨基酸添加、取代(例如保守性取代)或缺失。可通过以下方式来获得含有与某一VH区或VL区具有某一类似性百分比或具有一个或多个取代、缺失和/或插入(例如保守性取代)的VH区和VL区的抗ALK7抗体:对编码本文所述的VH区和/或VL区的核酸分子进行诱变(例如定点诱变或PCR介导的诱变),随后测试所编码经改变抗体与ALK7的结合,以及任选地使用本文所述的功能性测定或本领域中已

知的可常规地被修改以测试保留的功能的测定来测试保留的功能。

[0150] 可使用本领域中已知的任何适合方法以实验方式测定ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体(例如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)对hALK7或murALK7的亲和力或亲合力,所述方法例如是流式细胞计量术、酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)或动力学方法(例如BIACORE®或KINEXA®分析)。可容易地采用直接结合测定和竞争性结合测定形式。(参见例如Berzofsky等人,“Antibody-Antigen Interactions,”Fundamental Immunology,Paul,W.E.编,Raven Press:New York,N.Y.(1984);Kuby,Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,N.Y.(1992);以及本文所述的方法。)如果在不同条件(例如盐浓度、pH、温度)下测量,那么特定抗体-抗原相互作用的测量亲和力可变化。因此,用ALK7结合蛋白和ALK7的标准化溶液进行亲和力和其他ALK7结合参数(例如 K_D 或 K_d 、 $K_{\text{结合}}$ 、 $K_{\text{解离}}$)的测量,并且使用如本文所述或另外在本领域中已知的标准化条件和方法进行测量。

[0151] 本公开还提供了一种ALK7结合蛋白诸如如本文所述的抗ALK7抗体,其中所述ALK7结合蛋白缀合于异源剂。在某些实施方案中,异源剂是抗微生物剂、治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、脂质、生物应答调节剂、药剂、淋巴因子、异源性抗体或抗体片段、可检测标记或聚乙二醇(PEG)。异源缀合物ALK7结合蛋白在本文中其他地方更详细讨论。

[0152] 在某些实施方案中,ALK7结合蛋白不是抗ALK7抗体。用于鉴定和产生以高亲和力结合蛋白质靶标的非抗体多肽的多种方法在本领域中是已知的。参见例如Skerra,Curr.Opin.Biotech.18:295-304(2007);Hosse等人,Protein Science 15:14-27(2006);Gill等人,Curr.Opin.Biotechnol.17:653-658(2006);Nygren,FEBS J.275:2668-2676(2008);以及Skerra,FEBS J.275:2677-2683(2008),其各自通过引用以它的整体并入本文。在一些实施方案中,噬菌体展示技术可用于鉴定/产生ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白包含基于选自以下的类型的蛋白质骨架:VASP多肽、禽胰多肽(aPP)、四连接素(tetranectin)(基于CTLD3)、affilin(基于 γ B-晶状体蛋白(γ B-crystallin)/泛素)、打结素(knottin)、SH3结构域、PDZ结构域、淀粉酶抑肽(tendamistat)、转铁蛋白(transferrin)、锚蛋白(ankyrin)共有重复结构域(例如DARPin)、载脂蛋白(lipocalin)折叠(例如抗运载蛋白(anticalin)和双运载蛋白(Duocalin))、蛋白质表位模拟物(PEM)、maxybody/亲合多聚体(avimer)、结构域抗体、纤连蛋白(fibronectin)结构域(例如10Fn3,参见例如美国申请公布第2003/0170753和20090155275号,其各自通过引用以它的整体并入本文)、蛋白A的结构域(例如亲和体(Affibody))以及硫氧还蛋白(thioredoxin)。

[0153] 在一些实施方案中,本公开提供了一种交叉阻断本文提供的抗ALK7抗体结合ALK7,或与本文提供的抗ALK7抗体竞争结合ALK7的ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长抗ALK7抗体和ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,本公开提供了一种与本文提供的ALK7结合蛋白结合ALK7的相同表位的ALK7结合蛋白。测试ALK7结合蛋白抑制例如参考结合蛋白诸如包含SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列、SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列、SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列、或SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列的抗体与ALK7的结合的能力证明所述测试ALK7结合蛋白可与所述参考抗体竞争结合ALK7。根据非限制性理论,此种ALK7结合蛋白可与其竞争的ALK7参考抗体结合ALK7上的相同或相关(例如在结构上类似或在空间上邻近)表位。

在某些实施方案中,ALK7结合蛋白与分别包含SEQ ID NO:4的VH序列和SEQ ID NO:13的VL序列、SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:31的VL序列、SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列、或SEQ ID NO:58的VH序列和SEQ ID NO:67的VL序列的抗体结合ALK7上的相同表位。

[0154] 一般来说,已知的是1型TGF- β 受体家族成员诸如ALK7由II型受体(例如ActRIIA和ActRIIB)磷酸化,并且通过Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化来进行信号传导。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)可降低ALK7和II型受体表达性细胞(例如脂肪细胞)中由一种或多种II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)对ALK7的磷酸化。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)可降低ALK7和II型受体表达性细胞(例如脂肪细胞)中ALK7介导的Smad(例如Smad2和/或Smad3)磷酸化。在一些实施方案中,ALK7受体表达性细胞是鼠细胞。在一些实施方案中,ALK7受体表达性细胞是人细胞。在一些实施方案中,ALK7受体表达性细胞是脂肪细胞。

[0155] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有至少一种选自以下的特征:(a)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成;(b)与一种或多种II型受体竞争结合ALK7;(c)与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7;(d)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化;(e)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化;(f)以 $\leq 1\text{ nM}$ 且 $\geq 1\text{ pM}$ 的 K_D (例如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7,以及(g)降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的2者、3者或4者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的至少2者、至少3者或至少4者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0156] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白降低在TGF- β 超家族配体中的一者或多者存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至

60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0157] 在一些实施方案中,ALK7结合与一种或多种II型受体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0158] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化。在一些实施方案中,如使用基于细胞的测定所测量,ALK7结合蛋白降低Smad的磷酸化。在一些实施方案中,如使用基于细胞的测定所测量,ALK7结合蛋白以低于500pM、低于350pM、低于250pM、低于150pM、低于100pM、低于75pM、低于60pM、低于50pM、低于40pM、低于30pM、低于20pM、低于15pM、低于10pM或低于5pM的 IC_{50} 降低ALK7介导的磷酸化。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0159] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白以 ≤ 1 nM且 ≥ 1 pM的 K_D (例如如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的

ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0160] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段。

[0161] ALK7结合蛋白的制备

[0162] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白结合ALK7的细胞外结构域。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体诸如全长抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物。

[0163] 可容易地使用已知技术制备ALK7结合蛋白。可使用本领域中已知的技术制备单克隆抗ALK7抗体,所述技术包括杂交瘤方法,诸如由Kohler和Milstein,Nature 256:495-497 (1975)所述的那些。使用杂交瘤方法,如上所述使小鼠、仓鼠或其他适当宿主动物免疫以引发由淋巴细胞产生将特异性结合免疫抗原的抗体。还可在体外使淋巴细胞免疫。在免疫之后,将淋巴细胞分离,并且与适合骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞,可接着对所述杂交瘤细胞进行选择以与未融合淋巴细胞和骨髓瘤细胞分开。可接着使用标准方法(参见例如Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,1986)在体外培养中使如通过免疫沉淀、免疫印迹或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA);酶联免疫吸附测定(ELISA))确定的产生特异性针对ALK7诸如hALK7的单克隆抗体的杂交瘤增殖,或使所述杂交瘤在体内以腹水肿瘤形式在动物中增殖。可接着如以上对于多克隆抗体所述从培养基或腹水液纯化单克隆抗体。

[0164] 还可使用如美国专利第4,816,567号中所述的重组DNA方法制备提供的单克隆抗体,其中诸如通过使用特异性扩增编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物进行RT-PCR来从成熟B细胞或杂交瘤细胞分离编码单克隆抗体的多核苷酸,并且使用已知程序测定它们的序列。接着将编码重链和轻链的经分离多核苷酸克隆至适合表达载体中,所述表达载体在转染至否则不产生免疫球蛋白的宿主细胞诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Per.C6细胞或骨髓瘤细胞(例如NS0细胞)中时,由所述宿主细胞产生单克隆抗体。还可容易地使用已知技术从表达所需物种的CDR的噬菌体展示文库分离重组抗ALK7单克隆抗体(参见例如McCafferty等人,Nature 348:552-554 (1990);Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991);以及Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597 (1991))。

[0165] 可任选地将抗ALK7抗体人源化、表面重塑和工程改造以显示对ALK7抗原的高亲和力和其他有利生物性质。举例来说,可容易地使用通常可用的三维免疫球蛋白建模以及用于选择框架(FW)残基、共有序列和种系序列的已知程序来设计和制备人源化(或人)抗ALK7

抗体以提供所需抗体特征,诸如对ALK7的亲合力增加。

[0166] 亲合力成熟策略和链改组策略在本领域中是已知的,并且可用于产生高亲合力抗ALK7抗体以及本文公开的ALK7结合蛋白的衍生物和变体。参见例如Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992),其通过引用以它的整体并入本文。用于产生高亲合力抗ALK7抗体以及本文公开的ALK7结合蛋白的衍生物和变体的另一策略在于使用对一个或多个所选VH和/或VL基因的随机诱变以在整个可变结构域内产生突变来产生携带本公开的CDR源性序列的新型VH区或VL区。使用易出错PCR的此种技术由Gram等人(PNAS USA 89:3576-3580(1992))描述。在一些实施方案中,在一组VH CDR和/或VL CDR内产生一个或两个氨基酸取代。另一策略使用对编码本文公开的抗ALK7抗体的VH或VL基因的CDR区的直接诱变。此类技术的实例由Barbas等人(PNAS USA 91:3809-3813(1994))和Schier等人(J.Mol.Biol.263:551-567(1996))公开。

[0167] 可使用任何已知方法进行本公开的抗ALK7抗体的人源化、表面重塑或工程改造,所述方法包括但不限于Jones等人,Nature 321:522(1986);Riechmann等人,Nature 332:323(1988);Verhoeyen等人,Science 239:1534(1988)),Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901(1987),Carter等人,PNAS USA 89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993),美国专利第5,639,641、5,723,323;5,976,862;5,824,514;5,817,483;5,814,476;5,763,192;5,723,323;5,766,886;5,714,352;6,204,023;6,180,370;5,693,762;5,530,101;5,585,089;5,225,539;4,816,567,7,557,189;7,538,195;和7,342,110号;国际申请第PCT/US98/16280;PCT/US96/18978;PCT/US91/09630;PCT/US91/05939;PCT/US94/01234;PCT/GB89/01334;PCT/GB91/01134;PCT/GB92/01755号;国际申请公布第W090/14443;W090/14424;W090/14430号;以及欧洲专利公布第EP 229246号中所述的那些;所述专利和文献中的每一者通过引用以它的整体并入本文。同样,已知测定可用于容易地选择显示合乎需要的特征的抗ALK7抗体(例如用于测定对ALK7的结合亲和力的测定;交叉阻断测定诸如本文所述的基于BIACORE®的人ALK7结合蛋白竞争结合测定)。

[0168] 还可使用用于对非人抗体或人抗体进行工程改造、人源化或表面重塑的方法,并且所述方法在本领域中是已知的。人源化、表面重塑或以类似方式工程改造的抗体可具有一个或多个来自非人来源的氨基酸残基,所述非人来源例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些非人氨基酸残基用通常取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域的经常被称为“输入”残基的残基替换。此类输入序列可用于降低免疫原性,或降低、增强或改进结合、亲合力、缔合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他适合特征,如本领域中所知。优选地,维持非人CDR序列或人CDR序列的部分或全部,而可用人氨基酸或其他氨基酸替换可变区和恒定区的非人序列。

[0169] 可进一步使用重组DNA技术以许多不同方式修饰一个或多个编码ALK7结合蛋白诸如全长抗ALK7抗体的核酸以产生替代性抗体。在一些实施方案中,一个或多个编码例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域的核酸可被替代成(a)例如人抗体的那些编码区以产生嵌合抗体,或(b)一个或多个非免疫球蛋白编码核酸以产生融合抗体。在一些实施方案中,截短或移除恒定区以产生单克隆抗体的所需抗体片段。对可变区编码序列的定点诱变或高密度诱变可用于优化单克隆抗体的特异性、亲合力等。

[0170] 可使用本领域中已知的众多技术中的任一者来直接制备抗ALK7人抗体。(参见例如Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77页(1985); Boemer等人, *J. Immunol.* 147(1):86-95(1991); 以及美国专利第5,750,373号)。类似地,可容易地从在体外加以免疫或从经免疫个体分离的产生针对ALK7的抗体的永生化人B淋巴细胞获得人抗ALK7抗体。

[0171] 人抗ALK7抗体还可选自表达人抗体的噬菌体文库,如例如于Vaughan等人, *Nat. Biotech.* 14:309-314(1996), Sheets等人, *PNAS* 95:6157-6162(1998), Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991), 以及Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581(1991)中所述。用于产生和筛选抗体噬菌体文库的技术还描述于美国专利第5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081;6,300,064;6,653,068;6,706,484;和7,264,963号;以及Rothe等人, *J. Mol. Biol.* 376(4):1182-1200(2008)(其各自通过引用以它的整体并入本文)中。

[0172] 还可在能够在免疫后在不存在内源性免疫球蛋白产生下产生人抗体的含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人抗ALK7抗体。这个方法例如描述于美国专利第5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016号中。

[0173] 人抗ALK7抗体还可选自和/或分离自基于酵母的抗体呈现文库,如例如W0012/009568;W009/036379;W010/105256;W003/074679以及美国申请公布第US2002/0177170号中所公开,所述专利中的每一者的内容通过引用以它的整体并入本文。此类文库被电子设计来反映由人免疫前谱系提供的多样性。

[0174] 或者,抗ALK7抗体可选自酵母展示的抗体文库,参见例如:Blaise等人, *Gene* 342(2):211-218(2004); Boder等人, *Nat Biotechnol.* 15(6):553-557(1997); Kuroda等人, *Biotechnol. Lett.* 33(1):1-9(2011)。综述;Lauer等人, *J. Pharm. Sci.* 101(1):102-15(2012); Orcutt K.D.和Wittrup K.D. *Antibody Engineering, yeast display and selection* (2010), 207-233; Rakestraw等人, *Protein Eng. Des. Sel.* 24(6):525-30(2011); 以及美国专利第6,423,538;6,696,251;和6,699,658号。

[0175] 用于产生抗原结合抗体片段的各种技术是已知的。在传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来获得这些片段(参见例如Morimoto等人, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 24:107-117(1993); 以及Brennan等人, *Science* 229:81(1985))。在某些实施方案中,重组产生ALK7结合抗体片段。Fab、Fv和scFv抗体片段全都可在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达并从其分泌,由此允许产生大量的这些片段。另外,可从以上讨论的抗体噬菌体文库分离此种ALK7结合抗体片段。在一些实施方案中,ALK7结合抗体片段是如美国专利第5,641,870号中所述的线性抗体。用于产生抗原结合抗体片段的其他技术在本领域中是已知的。

[0176] 已知技术可容易地被改适来产生结合ALK7的单链抗体(参见例如美国专利第4,946,778号)。此外,已知方法可常规地被改适来构建Fab表达文库(参见例如Huse等人, *Science* 246:1275-1281(1989))以允许快速和有效鉴定对ALK7具有所需特异性的单克隆Fab片段。可通过本领域中已知的技术来产生ALK7结合抗体片段,包括但不限于:(a)通过胃蛋白酶消化抗体产生的F(ab')₂片段;(b)通过使F(ab')₂片段的二硫键还原产生的Fab片段,(c)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗ALK7抗体产生的Fab片段,和(d)Fv片段。

[0177] 在某些实施方案中,可修饰ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)以增加它的血清半衰

期。这可例如通过以下方式将补救受体结合表位并入至ALK7结合蛋白中来实现：使ALK7结合蛋白中的适当区域突变，或将补救受体表位并入至肽标签中，接着使所述肽标签在任一末端或在中间融合于ALK7结合蛋白（例如通过DNA或肽合成）。用以增加ALK7结合蛋白的血清半衰期增加的其他方法例如缀合于异源性分子诸如PEG在本领域中是已知的。

[0178] 异源缀合物ALK7结合蛋白（例如抗ALK7抗体，诸如全长抗ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物）也在本公开的范围。异源缀合物ALK7结合蛋白由两个共价接合的蛋白质组成。可以预期的是，可使用合成蛋白质化学中的已知方法，包括涉及交联剂的那些，在体外制备异源缀合物ALK7结合蛋白。举例来说，可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于这个目的的试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和4-巯基丁酰亚氨酸甲酯。

[0179] ALK7结合蛋白可包含提供抗体与ALK7的缔合的任何类型的可变区。此可变区可包括或源于可被诱导以发动体液应答以及产生针对ALK7抗原的免疫球蛋白的任何哺乳动物的可变区。抗ALK7抗体的可变区可例如具有人、鼠、非人灵长类动物（例如食蟹猴、猕猴等）或狼来源。在一些实施方案中，经修饰抗ALK7抗体的可变区与恒定区两者均是人源的。在其他实施方案中，可工程改造或特定调适可相容抗体的可变区（通常源于非人来源）以改善结合性质或降低分子的免疫原性。在这个方面，可通过使用亲和力成熟、诱变程序、链改组策略和/或本文所述或另外在本领域中已知的其他方法来包括输入的氨基酸序列以使根据本公开可用的可变区人源化或以其他方式改变。

[0180] 在某些实施方案中，通过至少部分替换一个或多个CDR以及/或者通过部分框架区替换和序列变化来改变抗ALK7抗体的重链与轻链两者中的可变结构域。尽管CDR可源于类别或甚至子类与框架区所源于的抗体相同的抗体，但设想CDR将源于不同类别的抗体，并且在某些实施方案中，将源于来自不同物种的抗体。不必要用来自供体可变区的完整CDR替换所有CDR以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一可变结构域。更确切来说，仅必要的是转移为维持抗原结合位点的活性所必需的那些残基。常规地获得免疫原性降低的功能性抗体完全在本领域普通技术人员的能力范围内。参见例如美国专利第5,585,089、5,693,761和5,693,762号。

[0181] 尽管存在对可变区的改变，但本领域普通技术人员将了解本公开的经修饰抗ALK7抗体将包括以下抗体：其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已被缺失或以其他方式改变以便当相较于包含天然或未改变恒定区的具有近似相同的免疫原性的抗体时提供所需生物化学特征，诸如降低的ADCC或增加的血清半衰期。在一些实施方案中，经修饰抗ALK7抗体的恒定区包括人恒定区。对恒定区的修饰可包括在一个或多个结构域中添加、缺失或取代一个或多个氨基酸。本文公开的经修饰抗ALK7抗体可包含对三个重链恒定结构域（CH1、CH2或CH3）中的一者或多者以及/或者对轻链恒定结构域（CL）的改变或修饰。在一些实施方案中，考虑包含其中一个或多个结构域被部分或完全缺失的恒定区的经修饰抗ALK7抗体。在一些实施方案中，经修饰抗ALK7抗体包含结构域缺失的构建体或变体，其中整个CH2结构域已被移除（ Δ CH2构建体）。在一些实施方案中，省略的恒定区结构域可用提供一部分通常由缺少的恒定区赋予的分子柔性的短氨基酸间隔体（例如10个残基）替换。

[0182] 通常了解的是，恒定区介导若干效应子功能。举例来说，补体的C1组分与抗体的结合使补体系统活化。补体的活化在细胞病原体的调理和溶解中是重要的。补体的活化还刺

激炎症反应,并且还可涉及于自身免疫超敏反应中。此外,抗体通过Fc区来结合细胞,其中抗体Fc区上的Fc受体位点结合细胞上的Fc受体(FcR)。存在对不同类别的抗体具有特异性的许多Fc受体,包括IgG(γ 受体)、IgE(η 受体)、IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合会触发许多重要和不同的生物应答,包括吞噬和破坏抗体包被的粒子,清除免疫复合物,由杀伤细胞溶解抗体包被的靶细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC),释放炎症性介质,胎盘转移,以及控制免疫球蛋白产生。

[0183] 在某些实施方案中,抗ALK7抗体具有改变的效应子功能,其转而影响施用的抗ALK7抗体的生物概况。举例来说,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他手段)可降低循环经修饰抗体的Fc受体结合。在其他情况下,恒定区修饰可缓和补体结合,因此,降低缀合的细胞毒素的血清半衰期和非特异性缔合。恒定区的其他修饰可用于消除二硫键或寡糖部分,此举由于抗原特异性或抗体柔性增加而允许达成定位增强。类似地,可容易地使用为本领域普通技术人员所知的生物化学或分子工程改造技术来进行根据本公开的对恒定区的修饰。

[0184] 在一些实施方案中,本文提供的ALK7结合蛋白是不具有一种或多种效应子功能的ALK7抗体。举例来说,在一些实施方案中,抗ALK7抗体不具有抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)活性,并且/或者不具有补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。在某些实施方案中,抗ALK7抗体不结合Fc受体和/或补体因子。在某些实施方案中,抗ALK7抗体不具有效应子功能。降低或消除ADCC和/或CDC活性以及Fc受体和/或补体因子结合的Fc序列工程改造修饰的实例在本文中描述或另外在本领域中是已知的,用于测试所述修饰的测定和程序也是如此。

[0185] 在一些实施方案中,抗ALK7抗体被工程改造来使CH3结构域直接融合于相应经修饰抗体的铰链区。在其他构建体中,肽间隔体插入在铰链区与经修饰CH2和/或CH3结构域之间。举例来说,可表达可相容构建体,其中CH2结构域已被缺失,并且剩余CH3结构域(经修饰或未修饰)以含5-20个氨基酸的间隔体接合于铰链区。可添加此种间隔体,例如以确保恒定结构域的调控元件保持自由和可及,或铰链区保持柔性。在一些情况下,氨基酸间隔体可被证明具有免疫原性,并且引发针对构建体的非所要免疫应答。因此,在某些实施方案中,添加至构建体中的任何间隔体都可为相对非免疫原性的,或甚至被完全省略,以便维持经修饰ALK7抗体的所需生物化学品质。

[0186] 在额外实施方案中,通过部分缺失或取代恒定区中的少许或甚至单一氨基酸来修饰抗ALK7抗体。举例来说,CH2结构域的所选区域中的单一氨基酸的突变可足以实质上降低Fc结合并且由此。类似地,可完全或部分缺失一个或多个控制效应子功能(例如补体C1q结合)的恒定区结构域。恒定区的此类部分缺失可改善抗ALK7抗体的所选特征(例如血清半衰期),同时使得与相应恒定区结构域相关的其他合乎需要的功能保持完整。在一些实施方案中,通过增强所得构建体的概况的对一个或多个氨基酸的突变或取代来修饰抗ALK7抗体的恒定区。在这个方面,有可能破坏由保守结合位点提供的活性(例如Fc结合),同时大致上维持经修饰抗ALK7抗体的构型和免疫原性概况。本公开还提供了一种抗ALK7抗体,其含有一个或多个氨基酸向恒定区的添加以增强合乎需要的特征,诸如降低或增加效应子功能,或为一个或多个细胞毒素部分、标记部分或碳水化合物部分提供衔接位点。在此类实施方案中,可为合乎需要的是插入或复制源于所选恒定区结构域的特定序列。

[0187] 本公开还提供了一种是本文提供的ALK7结合蛋白(例如鼠ALK7结合蛋白、嵌合

ALK7结合蛋白、人源化ALK7结合蛋白和人ALK7结合蛋白)的变体的ALK7结合蛋白。在特定实施方案中,变异ALK7结合蛋白具有至少一种选自以下的特征:(a)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成;(b)与一种或多种II型受体竞争结合ALK7;(c)与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7;(d)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化;(e)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化;(f)以 $\leq 1\text{nM}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的 K_D (例如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7,以及(g)降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的2者、3者或4者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白具有以上特征中的至少2者、至少3者或至少4者。

[0188] 可使提供的ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体衍生以含有本领域中已知的用于改善例如溶解性、生物半衰期、生物利用度的额外化学部分,并且以其他方式改善ALK7结合蛋白的稳定性、配制和/或治疗性质。对此类部分的非详尽概述可例如见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(2000)中。

[0189] 编码ALK7结合蛋白的核酸和它们的表达

[0190] 还提供了编码ALK7结合蛋白的核酸分子和核酸分子的组合。在一些实施方案中,核酸分子编码抗ALK7抗体,诸如全长抗ALK7抗体和ALK7结合抗体片段。在其他实施方案中,本公开提供了编码本文提供的全长抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段的变体或衍生物的核酸分子。

[0191] 本文公开的核酸分子可呈RNA形式或呈DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可为双链或单链,并且如果是单链,那么可为编码链/或非编码(反义)链。在某些实施方案中,核酸分子是经分离的。在额外实施方案中,核酸分子是大致上纯净的。在一些实施方案中,核酸是cDNA或源于cDNA。在一些实施方案中,核酸是重组产生的。

[0192] 在一些实施方案中,核酸分子包含可操作地连接于控制序列的ALK7结合蛋白编码序列,所述控制序列控制所述编码序列在宿主细胞中或在体外的表达。在特定实施方案中,编码序列是cDNA。本公开还涉及含有核酸分子的载体,所述核酸分子包含可操作地连接于控制序列的ALK7结合蛋白编码序列,所述控制序列控制所述编码序列在宿主细胞中或在体外的表达。

[0193] 在一些实施方案中,核酸分子包含成熟ALK7结合蛋白的编码序列,所述编码序列在同一阅读框中融合于异源性多核苷酸序列。在一些实施方案中,异源性多核苷酸序列编码有助于所表达蛋白质从用一种或多种ALK7结合蛋白编码核酸分子转化的宿主细胞分泌的前导肽序列。含有前导序列的蛋白质被称为前蛋白质,并且可具有由宿主细胞裂解以形成ALK7结合蛋白的成熟形式的前导序列。此类前导肽序列和它们的有助于宿主细胞中的重组蛋白的分泌的用途在本领域中是普遍已知的。在额外实施方案中,异源性多核苷酸序列编码可例如起有助于重组表达的ALK7结合蛋白的纯化,增加或改善蛋白质稳定性和/或治疗或诊断性质的作用的额外5'氨基酸残基。

[0194] 在一些实施方案中,本公开提供了足以用作杂交探针、PCR引物或测序引物的经分离核酸,诸如ALK7结合蛋白编码cDNA片段。

[0195] 在一些实施方案中,核酸分子编码具有至少一种选自以下的特征的ALK7结合蛋白:(a)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成;(b)与一种或多种II型受体竞争结合ALK7;(c)与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7;(d)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化;(e)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下,在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化;(f)以 $\leq 1\text{nM}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的 K_D (例如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7,以及(g)降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中,所编码ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中,所编码ALK7结合蛋白增加表达ALK7的脂肪细胞中的脂解。在一些实施方案中,所编码ALK7结合蛋白具有以上特征中的2者、3者或4者。在一些实施方案中,所编码ALK7结合蛋白具有以上特征中的至少2者、至少3者或至少4者。在一些实施方案中,所编码ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的ALK7结合VH和VL对的抗体与ALK7的结合,或与所述抗体竞争结合ALK7。在额外实施方案中,所编码ALK7结合蛋白与本文公开的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,所编码ALK7结合蛋白交叉阻断具有本文公开的VH和VL对的ALK7结合抗体与ALK7的结合,或与所述ALK7结合抗体竞争结合ALK7。在额外实施方案中,所编码ALK7结合蛋白与本文公开的抗体结合ALK7的相同表位。在其他实施方案中,核酸分子编码特异性结合ALK7,并且包含VH和VL的ALK7结合蛋白。

[0196] 在一些实施方案中,本公开提供了含有编码本文提供的ALK7结合蛋白的核酸和核酸组的载体和载体组。还提供了用这些核酸、核酸组、载体和载体组转化的宿主细胞,也提供了制备和使用ALK7结合蛋白的方法。

[0197] 在一些实施方案中,本公开提供了一种包含如上提供的核酸分子或核酸分子的组合或载体的宿主细胞,其中所述宿主细胞在一些情况下可表达特异性结合ALK7的ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段)。在其他实施方案中,本公开提供了一种用如上提供的核酸分子或核酸分子的组合或载体转化的宿主细胞,其中所述

宿主细胞在一些情况下可表达特异性结合ALK7的ALK7结合蛋白。此类宿主细胞可用于制备如本文提供的ALK7结合蛋白的方法中,其中所述方法包括(a)培养宿主细胞,以及(b)分离从宿主细胞表达的ALK7结合蛋白。

[0198] 本公开还提供了一种用于制备ALK7结合蛋白的方法,所述方法包括在适合条件下培养能够表达所述ALK7结合蛋白的宿主细胞(例如杂交瘤或经转化哺乳动物宿主细胞),并且任选地提供了一种用于分离从所述宿主细胞分泌的所述ALK7结合蛋白的方法。并且本公开另外提供了使用所公开方法分离的ALK7结合蛋白。

[0199] 在某些实施方案中,多核苷酸包含一种或多种成熟ALK7结合蛋白(例如ALK7抗体,诸如全长抗体和ALK7结合抗体片段)的一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列在同一阅读框中融合于例如允许纯化所编码多肽的标记序列。举例来说,在细菌宿主的情况下,标记序列可为由pQE-9载体提供的六组氨酸标签(SEQ ID NO:103)以提供对融合于标记的成熟多肽的纯化,或当使用哺乳动物宿主(例如COS-7细胞)时,标记序列可为源于流感血凝素蛋白的血凝素(HA)标签。

[0200] 还提供了编码ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体和ALK7结合抗体片段的核酸变体。核酸变体可在编码区、非编码区或两者中含有改变。在一些实施方案中,核酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失,但不改变所编码多肽的性质或活性的改变。在一些实施方案中,核酸变体通过归因于遗传密码的简并性的沉默取代来产生。核酸变体可出于多种原因而产生,例如为优化特定宿主的密码子表达(使人mRNA中的密码子变为细菌宿主诸如大肠杆菌偏好的那些)。还提供了包含本文所述的核酸的载体和细胞。

[0201] 在一些实施方案中,通过使用寡核苷酸合成仪进行化学合成来构建编码ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长抗体和ALK7结合抗体片段)的核酸序列。可基于所需多肽的氨基酸序列以及基于宿主细胞偏好的密码子优化来设计此类寡核苷酸。标准方法可常规地应用于合成编码ALK7结合蛋白的分离多核苷酸序列。

[0202] 一旦组装(通过合成、定点诱变或另一方法),即可常规地使编码ALK7结合蛋白的核酸序列可操作地连接于适于在所需宿主中表达ALK7结合蛋白的控制序列。在一些实施方案中,将一个或多个编码ALK7结合蛋白的核酸序列插入至一个或多个表达载体中,并且可操作地连接于一种或多种适于在所需宿主中表达蛋白质的控制序列。为获得所转染编码序列在宿主中的高表达水平,可使所述编码序列可操作地连接于在所选表达宿主中具有功能性的转录和翻译表达控制序列或与所述转录和翻译表达控制序列相关联。

[0203] 在某些实施方案中,重组表达载体用于扩增和表达编码ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体或ALK7结合抗体片段的DNA。重组表达载体是可复制DNA构建体,其具有编码ALK7结合蛋白的多肽链的合成或cDNA源性DNA片段,所述片段可操作地连接于源于哺乳动物基因、微生物基因、病毒基因或昆虫基因的适合转录或翻译调控元件。转录单元通常包含(1)一个或多个在基因表达中具有调控作用的遗传元件例如转录启动子或增强子,(2)被转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列,和(3)适当转录和翻译起始和终止序列的组件,如以下所详述。此类调控元件可包括用以控制转录的操纵子序列。可另外并有通常由复制起点赋予的在宿主中复制的能力以及用以有助于识别转化体的选择基因。当DNA区域在功能上彼此相关时,它们是可操作地连接的。举例来说,如果信号肽(分泌前导物)的DNA表达成参与多肽的分泌的前体,那么它可操作地连接于所述多肽的DNA;如果启动子控制编码序列的转

录,那么它可操作地连接于所述序列;或如果核糖体结合位点被定位以便容许翻译,那么它可操作地连接于编码序列。意图在酵母表达系统中使用的结构元件包括使得能够由宿主细胞对所翻译蛋白质进行细胞外分泌的前导序列。或者,当在无前导序列或运输序列下表达重组蛋白时,所述蛋白可包括N末端甲硫氨酸残基。这个残基可任选地随后从所表达重组蛋白裂解以提供最终蛋白质。在某些实施方案中,本公开提供了一种包含如以上或在本文中其他地方所述的核酸或载体,任选地还包含一种或多种载剂、稀释剂、赋形剂或其他添加剂的组合物,例如药物组合物。

[0204] 还提供了一种用本文公开的核酸分子或cDNA分子和/或载体转化的宿主细胞。本公开还提供了用一种或多种可操作地连接于控制序列并且任选地插入至载体中的所公开核酸分子转化的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。在其他实施方案中,哺乳动物宿主细胞是NS0鼠骨髓瘤细胞、PER.C6®人细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在其他实施方案中,宿主细胞是杂交瘤。

[0205] 在额外实施方案中,本公开提供了一种制备本文提供的ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)的方法,所述方法包括在适于产生所述ALK7结合蛋白的条件下培养本文公开的经转化宿主细胞或杂交瘤。本公开任选地提供了分离从宿主细胞分泌的ALK7结合蛋白。本公开还任选地提供了使用这个方法产生的ALK7结合蛋白以及包含ALK7结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0206] 对表达控制序列和表达载体的选择将取决于对宿主的选择。可采用广泛多种表达宿主/载体组合。可用于真核宿主的表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头状瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。可用于细菌宿主的表达载体包括已知细菌质粒,诸如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR1、pBR322、pMB9和它们的衍生物,并且还包括较广泛宿主范围质粒,诸如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0207] 适于表达ALK7结合蛋白的宿主细胞包括在适当启动子的控制下的原核生物、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌(bacilli)。高等真核细胞包括如下所述的哺乳动物来源的已建立细胞系。还可采用无细胞翻译系统。关于包括抗体产生的蛋白质产生的方法的额外信息可例如见于美国申请公布第2008/0187954号、美国专利第6,413,746和6,660,501号,以及国际申请公布第W004/009823号中,所述专利中的每一者通过引用以它的整体并入本文。

[0208] 各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统也可有利地用于表达重组ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)。可在哺乳动物细胞中进行重组ALK7结合蛋白的表达,因为此类蛋白通常被正确折叠,适当修饰,并且具有完全功能性。适合哺乳动物宿主细胞系的实例包括HEK-293和HEK-293T、由Gluzman(Cell 23:175(1981))描述的猴肾细胞的COS-7株系,以及其他细胞系,包括例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可包含非转录元件,诸如复制起点、连接于待表达基因的适合启动子和增强子、和其他5'或3'侧接非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,诸如必需的核糖体结合位点、多聚腺苷酸化位点、剪接供体和接受体位点,以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中产生异源性蛋白质的杆状病毒系统由Luckow和Summers,BioTechnology 6:47(1988)综述。

[0209] 可根据任何适合方法来纯化由经转化宿主细胞或杂交瘤产生的ALK7结合蛋白。此类标准方法包括色谱法(例如离子交换柱色谱法、亲和柱色谱法和尺寸分级柱色谱法)、离心、差异性溶解或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。可使亲和和标签诸如六组氨酸(SEQ ID NO:103)、麦芽糖结合结构域、流感病毒外壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶附接于蛋白质以允许通过穿过适当亲和柱来容易地纯化。还可使用诸如蛋白水解、核磁共振和x射线晶体照相术的技术来物理表征ALK7结合蛋白。

[0210] 举例来说,可首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置来浓缩由将重组ALK7结合蛋白分泌至培养基中的系统获得的上清液。在浓缩步骤之后,可将浓缩物施加于适合纯化基质。或者,可采用阴离子交换树脂,例如具有侧挂二乙基氨基乙基(DEAE)的基质或基材。基质可为丙烯酰胺、琼脂糖、右旋糖酐、纤维素或通常用于蛋白质纯化中的其他类型。或者,可采用阳离子交换步骤。适合阳离子交换剂包括包含磺丙基或羧甲基的各种不溶性基质。最后,一个或多个采用疏水性RP-HPLC介质例如具有侧挂甲基或其他脂族基团的硅胶的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)步骤可用于进一步纯化ALK7结合蛋白。呈各种组合形式的一些或所有前述纯化步骤也可常规地用于提供同质重组ALK7结合蛋白。

[0211] 可例如通过以下方式来分离在细菌培养中产生的重组ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物):初始从细胞集结块提取,随后进行一个或多个浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱法步骤。高效液相色谱法(HPLC)可用于最终纯化步骤。可通过任何适宜方法来破坏用于表达重组蛋白的微生物细胞,所述方法包括冻融循环、声波处理、机械破坏或使用细胞溶解剂。

[0212] 本领域中已知的用于纯化靶标结合蛋白诸如全长抗体和抗原结合抗体片段的方法还包括例如美国申请公布第2008/0312425、2008/0177048和2009/0187005号中所述的那些,所述美国申请公布中的每一者通过引用以它的整体并入本文。

[0213] 在某些实施方案中,ALK7结合蛋白不是抗体。用于鉴定和产生以高亲和力结合蛋白质靶标的非抗体多肽的多种方法是已知的。参见例如Skerra, Curr.Opin.Biotechnol.18:295-304(2007),Hosse等人,Protein Science 15:14-27(2006),Gill等人,Curr.Opin.Biotechnol.17:653-658(2006),Nygren,FEBS J.275:2668-2676(2008)以及Skerra,FEBS J.275:2677-2683(2008),其各自通过引用以它的整体并入本文。在某些实施方案中,噬菌体展示技术用于鉴定/产生ALK7结合蛋白。在某些实施方案中,多肽包含选自以下的类型的蛋白质骨架:蛋白A、载脂蛋白、纤连蛋白结构域(例如III型纤连蛋白(Fn3))、锚蛋白共有重复结构域和硫氧还蛋白。

[0214] 使用方法和药物组合物

[0215] 提供的ALK7结合蛋白(包括抗体、免疫缀合物和多肽)可用于用ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体)进行的多种应用中,包括但不限于诊断方法以及治疗和/或改善各种疾病和疾患的方法。提供了使用ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如特异性结合ALK7的全长抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)治疗患有与ALK7信号传导和/或改变的ALK7表达相关,并且/或者可通过降低ALK7信号传导来改善的疾病或疾患的受试者的方法。在额外实施方案中,本公开提供了一种含有本文提供的ALK7结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,本公开提供了一种用作药剂的含有本文提供的ALK7

结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。本公开还提供了本文公开的药物组合物用于治疗/或改善与ALK7信号传导、改变的ALK7表达相关,并且/或者可通过降低ALK7信号传导来改善的疾病或疾患的用途。在一些实施方案中,使用本文提供的药物组合物治疗的疾病或疾患是肥胖(例如腹部肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和高胆固醇血症);心血管疾病,诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);或癌症(诸如骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤和髓外骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌和结肠癌;或与以上疾病或疾患中的一者或多者相关的另外的病症/疾患。在一些实施方案中,使用本文提供的药物组合物治疗的疾病或疾患与超重(例如 $\geq 25\text{kg/m}^2$ 的BMI)或与体脂过多相关。

[0216] 在一些实施方案中,药物组合物含有ALK7结合蛋白(例如抗ALK7拮抗剂抗体)和药学上可接受的载体,并且所述ALK7结合蛋白还包含标记基团或效应物基团。“标记”是指一种或多种被附接以使得能够在筛选中进行检测的元素、同位素或化合物。标记通常属于三个类别:(a)同位素标记,其可为放射性同位素或重同位素,(b)小分子标记,其可包括荧光和比色染料,或使得能够进行其他标记方法的分子诸如生物素,和(c)免疫标记,其可为由抗体识别的作为融合配偶体并入的表位,“标记基团”是指任何可检测标记。在一些实施方案中,标记基团通过间隔体(例如肽间隔体)来偶联于ALK7结合蛋白以降低潜在空间位阻。标记可在任何位置处并入至化合物中,并且可在体外或在体内在蛋白质表达期间并入。用于对蛋白质进行标记的各种方法在本领域中是已知的,并且可用于进行提供的方法。在额外实施方案中,标记基团选自:同位素标记、磁性标记、氧化还原活性部分、光学染料、生物素化基团和由二级报告体识别的多肽表位。在一些实施方案中,标记基团是荧光蛋白,诸如绿色荧光蛋白或其衍生物(例如增强型GFP)、蓝色荧光蛋白或其衍生物(例如EBFP(增强型蓝色荧光蛋白)、EBFP2、Azurite、mKalama1)、青色荧光蛋白或其衍生物(例如ECFP(增强型青色荧光蛋白))、Cerulean、CyPet)、黄色荧光蛋白或其衍生物(例如YFP、Citrine、Venus、YPet)。在一些实施方案中,多肽表位是选自生物素信号传导肽、组氨酸肽(his)、血凝素(HA)、Flag、金结合肽的成员。在额外实施方案中,效应物基团选自放射性同位素、放射性核苷酸、毒素、治疗剂和化学治疗剂。

[0217] 本公开的ALK7结合蛋白可应用于体外和体内诊断和治疗用途。举例来说,可将ALK7结合蛋白施用至培养(例如在体外或在体内)中或受试者中的细胞以治疗、预防或诊断多种疾病或疾患。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是人抗体、鼠抗体或人源化抗体。

[0218] 还提供了阻断ALK7活性的方法。在一些实施方案中,方法包括使ALK7与拮抗剂ALK7结合蛋白接触。在其他实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体。在一些情况下,方法在体内进行。在其他情况下,方法在体外进行。在一些实施方案中,阻断的ALK7活性选自(a)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体存在下,在表达ALK7和ActRII受体的细胞的表面上,含有ALK7、II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)和所述一种或多种TGF- β 超家族配体

(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)的复合物的形成；(b)与一种或多种II型受体竞争结合ALK7；(c)与一种或多种TGF- β 超家族配体(例如活化素B、活化素AB、Nodal、GDF1、GDF3和/或GDF8)竞争结合ALK7；(d)降低在一种或多种TGF- β 超家族配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下，在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA或ActRIIB)的细胞中ALK7的磷酸化；(e)降低在一种或多种TGF- β 配体(例如GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素AB和/或Nodal)存在下，在表达ALK7和II型受体(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的细胞中Smad(例如Smad2和/或Smad3)的磷酸化；(f)以 $\leq 1\text{nM}$ 且 $\geq 1\text{pM}$ 的 K_D (例如如通过BIACORE®分析所测定)结合ALK7，以及(g)降低含有ALK7、共受体(例如cripto和/或cryptic)和一种或多种TGF- β 超家族配体(例如Nodal)的复合物的形成。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂(例如中和抗ALK7抗体)。在其他实施方案中，ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白在使用脂肪细胞(例如白色脂肪细胞)的脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中，脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行：GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白具有以上特征中的2者、3者或4者。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白具有以上特征中的至少2者、至少3者或至少4者。

[0219] 在某些实施方案中，本公开提供了对疾病或疾患的治疗、预防和/或改善，所述治疗、预防和/或改善包括将ALK7结合蛋白(例如抗ALK7拮抗剂抗体)施用至患有与ALK7信号传导、改变的ALK7表达相关，并且/或者可通过降低ALK7信号传导来改善的疾病或疾患，或处于显现所述疾病或疾患的风险下的受试者。在其他实施方案中，治疗包括将ALK7结合蛋白施用至从受试者分离的组织或细胞，其中所述受试者患有与ALK7表达或ALK7信号传导相关的疾病或疾患，或处于显现所述疾病或疾患的风险下。

[0220] 本公开提供了包含ALK7结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。还提供了用于治疗 and/或改善受试者中的与ALK7介导的活性相关的疾患的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的包含本文提供的ALK7结合蛋白的药物组合物。在一些实施方案中，单独施用ALK7结合蛋白。在其他实施方案中，以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。还提供了降低受试者中的ALK7活性的方法，所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白施用至有需要的受试者。

[0221] 如本文所提供，可施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)以减轻体重(例如促进体重减轻)，减少体重增加(例如预防体重增加)，以及/或者治疗肥胖。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中，施用的抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7，或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中，施用的抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在某些情况下，受试者患有2型糖尿病。

[0222] 在某些实施方案中，本公开提供了一种减轻体重的方法，所述方法包括向需要减轻体重或有需要的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中，ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一

些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者是超重的(例如处于肥胖前期)。在一些实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的体质指数(BMI)。在其他实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者是肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大(例如30至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$)的BMI。在一些实施方案中,受试者是病态肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在其他实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $45\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者患有向心性肥胖(例如腹部区域中脂肪过多,包括腹部脂肪和/或内脏脂肪)。在一些实施方案中,受试者具有0.85或更大的腰围/臀围比(WHR)。在一些实施方案中,受试者患有周围型肥胖(例如臀部上脂肪过多)。在一些实施方案中,受试者患有2型糖尿病。单独或以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0223] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减少体重增加的方法,所述方法包括向需要减少体重增加或有需要的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。

[0224] 在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者是超重的(例如处于肥胖前期)。在一些实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在其他实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者是肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大(例如30至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$)的BMI。在一些实施方案中,受试者是病态肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在其他实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $45\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者患有2型糖尿病。

[0225] 还提供了一种治疗或预防与体重超标相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向需要治疗或预防的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是肥胖。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是胰岛素抵抗。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下的成员:血脂异常、高脂血症(总胆固醇水平 $>240\text{mg}/\text{dL}$)、高胆固醇血症(例如 $>200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>220\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>240\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>250\text{mg}/\text{dL}$ 或 $>275\text{mg}/\text{dL}$ 的总胆固醇水平)、低HDL血清水平(例如 $<40\text{mg}/\text{dL}$ 、 $<45\text{mg}/\text{dL}$ 或 $<50\text{mg}/\text{dL}$)、高LDL血清水平(例如 $\geq 100\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 130\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 160\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 190\text{mg}/\text{dL}$)、以及高甘油三酯血症(例如 $\geq 150\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 175\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 300\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 400\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 499\text{mg}/\text{dL}$ 的空腹TG水平)。在某些情况下,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0226] 在其他实施方案中,本公开提供了一种减轻超重受试者的体重的方法。方法包括向超重受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的体质指数(BMI)。在其他实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 27 至 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者是肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大(例如 30 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$)的BMI。单独或以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0227] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减轻肥胖受试者的体重的方法。方法包括向受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大(例如 30 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$)的BMI。在一些实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在一些实施方案中,受试者患有向心性肥胖(例如腹部区域中脂肪过多,包括腹部脂肪和/或内脏脂肪)。在一些实施方案中,受试者具有 0.85 或更大的腰围/臀围比(WHR)。在一些实施方案中,受试者患有周围型肥胖(例如臀部上脂肪过多)。单独或以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0228] 在其他实施方案中,本公开提供了一种治疗和/或改善肥胖或与肥胖相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向肥胖受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在其他实施方案中,受试者具有 30 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者是病态肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的身体BMI。在其他实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $45\text{kg}/\text{m}^2$ 、或 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者患有2型糖尿病。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大(例如 30 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$)的BMI。在一些实施方案中,受试者具有至少 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者患有向心性肥胖(例如腹部区域中脂肪过多,包括腹部脂肪和/或内脏脂肪)。在一些实施方案中,受试者具有 0.85 或更大的腰围/臀围比(WHR)。在一些实施方案中,受试者患有周围型肥胖(例如臀部上脂肪过多)。单独或以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0229] 还提供了一种治疗或预防与肥胖相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向需要治疗或预防的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下的成员:血脂异常、高脂血症(总胆固醇水平 $>240\text{mg/dL}$)、高胆固醇血症(例如 $>200\text{mg/dL}$ 、 $>220\text{mg/dL}$ 、 $>240\text{mg/dL}$ 、 $>250\text{mg/dL}$ 或 $>275\text{mg/dL}$ 的总胆固醇水平)、低HDL血清水平(例如 $<40\text{mg/dL}$ 、 $<45\text{mg/dL}$ 或 $<50\text{mg/dL}$)、高LDL血清水平(例如 $\geq 100\text{mg/dL}$ 、 $\geq 130\text{mg/dL}$ 、 $\geq 160\text{mg/dL}$ 或 $\geq 190\text{mg/dL}$)、以及高甘油三酯血症(例如 $\geq 150\text{mg/dL}$ 、 $\geq 175\text{mg/dL}$ 、 $\geq 200\text{mg/dL}$ 、 $\geq 300\text{mg/dL}$ 、 $\geq 400\text{mg/dL}$ 或 $\geq 499\text{mg/dL}$ 的空腹TG水平)。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是心血管疾病。在额外实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是高血压(血压高)、心肌梗死、中风、外周动脉疾病、血管调控功能异常、动脉硬化、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、冠心病或微血管疾病。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是炎症。在其他实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下组的成员:视网膜病变、肠病、溃疡性结肠炎和哮喘、炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是肝病。在某些实施方案中,治疗或预防的肝脏疾病或疾患是NAFLD。在某些实施方案中,肝病是脂肪肝。在某些实施方案中,肝病是NASH。在其他实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下组的成员:脂肪性肝炎、脂肪变性、纤维化和/或肝硬化。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下的成员:白内障、黄斑变性、阻塞性睡眠呼吸暂停、静脉炎、痛风、骨关节炎、胆囊疾病、肾病、肺病(例如哮喘、低通气综合征或呼吸功能异常)和/或癌症(例如卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌和/或结肠癌)和/或癌症转移(例如淋巴转移、血流转移和/或肿瘤生长和侵袭)。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是感染。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是伤口愈合缓慢或难愈合。在某些情况下,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0230] 在某些实施方案中,本公开提供了一种降低肝脂肪的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至有需要的受试者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者是超重的(例如处于肥胖前期)。在一些实施方案中,受试者具有 25kg/m^2 或更大的体质指数(BMI)。在其他实施方案中,受试者具有 25kg/m^2 至 29.9kg/m^2 、 30kg/m^2 至 39.9kg/m^2 、 25kg/m^2 至 39.9kg/m^2 、或 25kg/m^2 至 50kg/m^2 的BMI。在一些实施方案中,受试者是肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 30kg/m^2 或更大(例如 30 至 39.9kg/m^2 或 30kg/m^2 至 50kg/m^2)的BMI。在一些实施方案中,受试者是病态肥胖的。在一些实施方案中,受试者具有 40kg/m^2 或更大的BMI。在其他实施方案中,受试者具有 40kg/m^2 至 45kg/m^2 、或 40kg/m^2 至 50kg/m^2 的BMI。在一些实施方案中,受试者患有向心性肥胖(例如腹部区域中脂肪过多,包括腹部脂肪和/或内脏脂肪)。在一些实施方案中,受试者具有0.85或更大的腰围/臀围比

(WHR)。在一些实施方案中,受试者患有周围型肥胖(例如臀部上脂肪过多)。在一些实施方案中,受试者患有2型糖尿病。单独或以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0231] 在其他实施方案中,本公开提供了一种治疗、改善和/或预防2型糖尿病或与糖尿病相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向患有2型糖尿病或处于显现2型糖尿病的风险下的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大(例如 30 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$)的体质指数BMI。在一些实施方案中,受试者具有至少 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者患有向心性肥胖(例如腹部区域中脂肪过多,包括腹部脂肪和/或内脏脂肪)。在一些实施方案中,受试者具有 0.85 或更大的WHR。在一些实施方案中,受试者患有周围型肥胖(例如臀部上脂肪过多)。单独或以组合疗法形式施用ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0232] 还提供了一种治疗、改善或预防与糖尿病相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向患有糖尿病的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的ALK7结合蛋白(例如拮抗剂抗体)与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下的成员:血脂异常、高脂血症(总胆固醇水平 $>240\text{mg}/\text{dL}$)、高胆固醇血症(例如 $>200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>220\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>240\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>250\text{mg}/\text{dL}$ 或 $>275\text{mg}/\text{dL}$ 的总胆固醇水平)、低HDL血清水平(例如 $<40\text{mg}/\text{dL}$ 、 $<45\text{mg}/\text{dL}$ 或 $<50\text{mg}/\text{dL}$)、高LDL血清水平(例如 $\geq 100\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 130\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 160\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 190\text{mg}/\text{dL}$)、以及高甘油三酯血症(例如 $\geq 150\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 175\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 300\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 400\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 499\text{mg}/\text{dL}$ 的空腹TG水平)。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是心血管疾病。在额外实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是高血压(血压高)、心肌梗死、中风、外周动脉疾病、血管调控功能异常或动脉硬化。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是炎症(例如全身性炎症、肝脏炎症和脂肪组织炎症)。在其他实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下组的成员:动脉粥样硬化视网膜病变、肠病、溃疡性结肠炎、哮喘、肝脏炎症和/或脂肪组织炎症。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是肝病。在其他实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下组的成员:脂肪肝病、脂肪性肝炎、脂肪变性和/或肝硬化。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是选自以下的成员:白内障、黄斑变性、阻塞性睡眠呼吸暂停、静脉炎、痛风、骨关节炎、胆囊疾病、高胆固醇、肺病(例如哮喘和/或低通气综合征)、神经病变、视网膜病变、血管病变、微血管病变、肾病变、肾衰竭和/或癌症(例如卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌和/或结肠癌)和癌症转移(例如淋巴转移、血流转移和/或肿瘤生长和侵袭)。在某些实施方案中,治疗或预防的疾病或疾患是感染或伤口难愈合。在某些情况下,施用是膳食和/或运动的辅助。

[0233] 本公开还提供了一种用于改善受试者中的血液脂质概况的方法,所述方法包括向需要此治疗的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂(中和)抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的抗体。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是ALK7拮抗剂抗体。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于降低LDL胆固醇的水平或增加HDL胆固醇的水平的方法。在某些实施方案中,受试者患有血脂异常。在其他实施方案中,受试者具有升高的血清脂质(例如胆固醇(高胆固醇血症)和/或甘油三酯(例如高甘油三酯血症))。在某些实施方案中,受试者具有LDL-C $\geq 100\text{mg/dL}$ 、 $\geq 130\text{mg/dL}$ 或 $\geq 160\text{mg/dL}$ 。在某些实施方案中,受试者具有TG $\geq 150\text{mg/dL}$ 、 $\geq 160\text{mg/dL}$ 、 $\geq 170\text{mg/dL}$ 。在某些实施方案中,受试者具有升高的血浆胰岛素水平(高胰岛素血症;例如 $> 20\text{ug/ml}$ 的空腹胰岛素水平可超过100)。在一些实施方案中,受试者患有II型糖尿病。

[0234] 根据某些实施方案,本公开提供了一种治疗或预防代谢疾病或病症或与代谢疾病或病症相关的疾患的方法,所述方法包括将ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至有需要的受试者。在某些实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或疾患是高血糖症(例如在空腹状态下或在口服葡萄糖耐量测试期间在葡萄糖施用之后 $> 130\text{mg/dL}$)。在某些实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或疾患是脂质代谢疾病、病症或疾患。在某些实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或疾患是血脂异常。在其他实施方案中,脂质代谢疾病、病症或疾患是选自以下的成员:低HDL水平、高LDL水平、高甘油三酯水平、高脂血症和脂蛋白异常。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有 $> 200\text{mg/dL}$ 、 $> 220\text{mg/dL}$ 、 $> 240\text{mg/dL}$ 、 $> 250\text{mg/dL}$ 或 $> 275\text{mg/dL}$ 的总胆固醇水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有 $< 40\text{mg/dL}$ 、 $< 45\text{mg/dL}$ 或 $< 50\text{mg/dL}$ 的HDL血清水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有LDL血清水平 $\geq 100\text{mg/dL}$ 、 $\geq 130\text{mg/dL}$ 、 $\geq 160\text{mg/dL}$ 或 $\geq 190\text{mg/dL}$ 。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有 $\geq 150\text{mg/dL}$ 、 $\geq 175\text{mg/dL}$ 、 $\geq 200\text{mg/dL}$ 、 $\geq 300\text{mg/dL}$ 、 $\geq 400\text{mg/dL}$ 或 $\geq 499\text{mg/dL}$ 的空腹TG水平。在某些实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或疾患是葡萄糖代谢疾病、病症或疾患。在其他实施方案中,葡萄糖代谢疾病、病症或疾患是选自以下的成员:葡萄糖不耐受、胰岛素抵抗、葡萄糖耐量受损(IGT)、空腹葡萄糖受损(IFG)。在某些实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或疾患是选自以下的成员:高尿酸水平、NAFLD、脂肪肝、NASH和多囊卵巢综合征。在某些实施方案中,所治疗受试者患有高胰岛素血症。在某些实施方案中,所治疗受试者是肥胖的(例如受试者患有内脏或腹部肥胖)。在其他实施方案中,所治疗受试者患有II型糖尿病。

[0235] 代谢综合征是一种涉及增强心脏病风险的一组病症的疾患。代谢综合征的主要组成部分是超重、心血管参数(高血压、血脂异常、血液中的高甘油三酯水平和/或低HDL水平)、动脉粥样硬化、糖尿病和/或胰岛素抵抗。具有这些组成部分中的数者即代谢综合征的受试者高度易患心脏病,尽管每个组成部分是风险因素。本公开还提供了一种用于治疗或预防代谢综合征的以上组成部分中的1者、2者、3者或更多者的方法,所述方法包括向需要

治疗的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。

[0236] 本公开还提供了用于治疗、预防或改善受试者中的普拉德-威利综合征(Prader-Willi syndrome)或与普拉德-威利综合征相关的疾患的组合物和方法,所述方法包括向需要此治疗的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。普拉德-威利综合征,也称为拉布哈特-威利综合征(Labhart-Willi syndrome)、普拉德氏综合征(Prader's syndrome)、普拉德-拉布哈特-威利-范科尼综合征(Prader-Labhart-Willi-Fanconi syndrome),是一种影响身体的许多部分的复杂遗传疾患。在婴儿期,这个疾患的特征在于肌肉张力微弱(张力减退)、喂养困难、生长不良和发育延迟。在儿童期开始,受影响的个体显现食欲无法满足,此导致慢性过度进食(食欲过盛)和肥胖。患有普拉德-威利综合征的一些人,特别是肥胖者,还显现2型糖尿病(糖尿病的最常见形式)。患有普拉德-威利综合征的人通常具有轻度至中度的智力损害和学习失能。行为问题是常见的,包括脾气爆发、固执和强迫行为诸如皮肤搔抓。还可发生睡眠异常。这个疾患的额外特征包括独特面部特征,诸如前额狭窄、杏仁形眼和三角形口;身材矮小;以及小手和小脚。患有普拉德-威利综合征的一些人具有异常白皙的皮肤和浅色头发。受影响的男性与受影响的女性两者的生殖器均发育不全。青春期延迟或不完全,并且大多数受影响的个体不能生育孩子(不育)。其他相关症状可从婴儿期期间的肌肉张力不良至儿童期早期的行为问题和婴儿期期间的症状,诸如眼协调缺乏、天生具有杏仁形眼、吮吸反射强烈(归因于肌肉张力不良)、哭声微弱、醒来困难、上唇薄等。成年期症状包括例如不育、性腺功能减退、阴毛稀疏、肥胖、张力减退(肌肉张力低下)、学习失能/边界智力功能、易患糖尿病、极度柔韧性等。当前,它是通过遗传测试(父系PWS/AS区域的丧失)以及临床表现来诊断的。

[0237] 普拉德-威利综合征通常由丧失父系染色体15的区段(约70%患者)或具有两个拷贝的母系染色体15(母系单亲二体性;约25%患者)引起。罕见地,普拉德-威利综合征还可由称为易位的染色体重排,或由异常关闭(失活)父系染色体15上的基因的突变或其他缺陷引起。染色体15上导致普拉德-威利综合征的区段处于区域15q11-13(所谓的PWS/AS区域)中,至少包含包括小核糖核蛋白相关蛋白N(SNRPN)和神经分化胚胎癌源性蛋白(necdin, NDN)的基因,以及小核仁RNA(snoRNA)簇,诸如SNORD64、SNORD107、SNORD108以及两个拷贝的SNORD109、29个拷贝的SNORD116(HBII-85)和48个拷贝的SNORD115(HBII-52)。母系染色体上相同区域的缺失导致安吉尔曼综合征(AS)。PWS和AS代表人类中印迹病症的最初报道实例。

[0238] 普拉德-威利综合征不具有治愈方法。然而,有若干治疗处于使用中以减轻所述疾患的症状。在婴儿期期间,受试者应经受用以改善肌肉力量的疗法,诸如生长激素(GH)疗法(例如每日GH注射)。还指示了言语和作业疗法。气道正压机经常为归因于重度肥胖的阻塞性睡眠呼吸暂停所需。在一些情况下,可使用手术程序。在减轻脾气焦躁以及改善强迫性方面,血清素激动剂已是最有效的。

[0239] 在一些实施方案中,本文所述的ALK7结合蛋白用于治疗、预防或改善普拉德-威利综合征或与普拉德-威利综合征相关的疾患。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7蛋白,诸如拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段,例如本文公开的拮抗剂抗ALK7抗体

或其ALK7结合片段。

[0240] 另外提供了一种治疗、预防或改善心血管疾病或疾患的方法,所述方法包括将ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至有需要的受试者。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的心血管疾病或疾患是动脉粥样硬化。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的心血管疾病或疾患是高血压(例如在静息状态下的血压>130/80mmHg或>140/90mmHg)。在某些实施方案中,心血管疾病或疾患是外周血管疾病、微血管或微血管并发症、中风和/或视网膜病变。在某些实施方案中,心血管疾病是动脉粥样硬化(冠心病)。

[0241] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗 and/或改善炎症性疾病或疾患的方法,所述方法包括将ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至有需要的受试者。在某些实施方案中,炎症性疾病或疾患是慢性炎症。在其他实施方案中,炎症性疾病或疾患是脂肪组织炎症。在其他实施方案中,疾病或疾患是肝脏炎症。在某些实施方案中,疾病或疾患是NAFLD。在其他实施方案中,疾病或疾患是脂肪肝。在其他实施方案中,疾病或疾患是脂肪变性(例如非酒精性脂肪性肝炎)(NASH)。

[0242] 本公开还提供了一种改善血糖控制的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有>130、>135、>140、>145或>150mg/dL的空腹血糖水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有在进食之后2小时>180、>185、>190、>195或>200mg/dL的餐后血糖水平。在某些情况下,施用是膳食和/或运动的辅助。施用还可减轻体重或治疗肥胖。在某些情况下,受试者患有2型糖尿病。在某些情况下,受试者具有27至40kg/m²的BMI。在某些情况下,受试者具有30至39.9kg/m²的BMI。在某些情况下,受试者具有至少40的BMI。在某些情况下,受试者是超重的。在某些情况下,受试者是肥胖的。可使用本领域中已知的技术诸如混合餐测试来评估血糖控制的改善。

[0243] 本公开还提供了用于治疗、预防或改善受试者中的高血糖症或与高血糖症相关的疾患的组合物和方法,所述方法包括向需要此治疗的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有>130、>135、>140、>145或>150mg/dL的空腹血糖水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有在进食之后2小时>180、>185、>190、>195或>200mg/dL的餐后血糖水平。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的结果是选自以下的成员:相较于在治疗之前受试者中的血清水平,血清葡萄糖水平降低、血清甘油三酯水平降低、血清胰岛素水平降低和/或血清非酯化脂肪酸水平降低。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的结果是相较于在治疗之前受试者的体温,体温增加约0.4℃至1℃。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,施用还减轻受试者的体重。

[0244] 在其他实施方案中,本公开提供了一种降低受试者中的血浆胰岛素水平的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至需要此治疗的受试者。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有>130、>135、>140、>145或>150mg/dL的空腹血糖水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有在进食之后2小时>180、>185、>190、>195或>200mg/dL的餐后血糖水平。在某些实施方案中,受试者是超重的。在某些实施方案中,受试者是肥胖的。在其他实施方案中,受试者患有2型糖尿病。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。

[0245] 本公开还提供了用于治疗、预防或改善受试者中的高血糖症或与高血糖症相关的疾患的组合物和方法,所述方法包括向需要此治疗的受试者施用有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有>130、>135、>140、>145或>150mg/dL的空腹血糖水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有在进食之后2小时>180、>185、>190、>195或>200mg/dL的餐后血糖水平。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的结果是选自以下的成员:相较于在治疗之前受试者中的血清水平,血清葡萄糖水平降低、血清甘油三酯水平降低、血清胰岛素水平降低和/或血清非酯化脂肪酸水平降低。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的结果是相较于在治疗之前受试者的体温,体温增加约0.4℃至1℃。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,施用还减轻受试者的体重。

[0246] 在其他实施方案中,本公开提供了一种降低受试者中的血浆胰岛素水平的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至需要此治疗的受试者。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有>130、>135、>140、>145或>150mg/dL的空腹血糖水平。在某些实施方案中,向其施用ALK7结合蛋白的受试者具有在进食之后2小时>180、>185、>190、>195或>200mg/dL的餐后血糖水平。在某些实施方案中,受试者是超重的。在某些实施方案中,受试者是肥胖的。在其他实施方案中,受试者患有2型糖尿病。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。

[0247] 在其他实施方案中,本公开提供了一种治疗、预防或改善受试者中的肝病的方法,所述方法包括将有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)施用至患有肝病的受试者。在某些实施方案中,受试者患有肝脏炎症。在某些实施方案中,受试者患有NAFLD。在一些实施方案中,受试者患有脂肪肝。在其他实施方案中,受试者患有NASH。在某些实施方案中,治疗、预防或改善的肝病是纤维化、瘢痕形成、肝硬化或肝功能衰竭。在其他实施方案中,治疗、预防或改善的肝病是肝癌。在某些实施方案中,受试者是超重的。在其他实施方案中,受试者是肥胖的。在其他实施方案中,受试者患有2型糖尿病。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7蛋白。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是本文公开的拮抗剂抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,施用的拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。

[0248] 在额外实施方案中,本公开提供了治疗和/或改善癌症或与癌症相关的疾患的方法,所述方法包括将ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体或其ALK7结合片段)施用至有需要的受试者。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白是抗ALK7抗体或其ALK7结合片段。在一些实施方案中,受试者患有选自以下的癌症:骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌。在一些实施方案中,施用ALK7结合蛋白以治疗或预防淋巴转移、血流转移、肿瘤生长或肿瘤侵袭。

[0249] 在某些实施方案中,本公开提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括使表达ALK7的癌细胞、肿瘤相关基质细胞或内皮细胞与ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)接触。在额外实施方案中,癌细胞是骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌和/或结肠癌细胞。在一些实施方案中,接触的细胞来自癌症株系。在一些实施方案中,在体内接触癌细胞。

[0250] 在某些实施方案中,本公开提供了一种增加脂解的方法,所述方法包括使白色脂肪细胞或脂肪组织与拮抗剂ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)接触。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白使脂肪细胞中的脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在一些实施方案中,ALK7结合蛋白在脂解测定中使脂解增加5%至100%、10%至80%、或10%至60%。在其他实施方案中,脂解测定在一种或多种选自以下的ALK7配体存在下进行:GDF1、GDF3、GDF8、活化素B、活化素A/B和Nodal。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体包括本文提供的抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,在体外接触白色脂肪细胞或脂肪组织。在一些实施方案中,在体内接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在某些实施方案中,方法在体内,例如在哺乳动物受试者(例如动物模型)中进行。在其他实施方案

中,受试者是人。在一些实施方案中,方法导致甘油产生增加。在其他实施方案中,方法导致脂肪细胞培养物中甘油和/或游离脂肪酸增加。在一些实施方案中,方法导致脂肪细胞或组织中甘油三酯(TG)含量降低。在一些实施方案中,方法导致受试者中血浆TG水平降低。

[0251] 在其他实施方案中,本公开提供了一种增加脂肪细胞或组织中的肾上腺素能受体- β (ADRB) 信号传导的方法。方法包括使分化的白色脂肪细胞或脂肪组织与足以增加ADRB信号传导的量的拮抗剂ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)接触。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体包括本文提供的抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,在体外接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在一些实施方案中,在体内接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在某些实施方案中,方法在体内,例如在哺乳动物受试者(例如动物模型)中进行。在其他实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,方法导致甘油产生增加。在其他实施方案中,方法导致脂肪细胞培养物中甘油和/或游离脂肪酸增加。在一些实施方案中,方法导致脂肪细胞或组织中TG含量降低。在一些实施方案中,方法导致受试者中血浆TG水平降低。在一些实施方案中,方法导致在营养物过载期间脂肪细胞或脂肪组织中ADRB信号传导增加。

[0252] 在其他实施方案中,本公开提供了一种降低脂肪细胞或脂肪组织(例如分化的白色脂肪细胞)中的过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (PPAR γ) 信号传导的方法。方法包括使分化的白色脂肪细胞或脂肪组织与有效降低PPAR γ 活性的量的拮抗剂ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)接触。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体包括本文提供的抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,在体外接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在一些实施方案中,在体内接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在某些实施方案中,方法在体内,例如在哺乳动物受试者(例如动物模型)中进行。在其他实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,方法导致甘油产生增加。在其他实施方案中,方法导致脂肪细胞培养物中甘油和/或游离脂肪酸增加。在一些实施方案中,方法导致脂肪细胞或组织中TG含量降低。在一些实施方案中,方法导致受试者中血浆TG水平降低。

[0253] 在其他实施方案中,本公开提供了一种降低脂肪细胞或脂肪组织(例如分化的白色脂肪细胞)中的胰岛素抵抗的方法。方法包括使脂肪细胞或脂肪组织与有效降低胰岛素抵抗的量的拮抗剂ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)接触。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体包括本文提供的抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,在体外接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在一些实施方案中,在体内接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在某些实施方案中,方法在体内,例如在哺乳动物受试者(例如动

物模型)中进行。在其他实施方案中,受试者是人。

[0254] 在其他实施方案中,本公开提供了一种增加脂肪细胞或组织的代谢速率的方法。方法包括使脂肪细胞或脂肪组织与有效增加所述脂肪细胞或组织的代谢的量的拮抗剂ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)接触。在一些实施方案中,拮抗剂ALK7结合蛋白是抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体包括本文提供的抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗体交叉阻断具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7,或与所述抗体竞争结合ALK7。在一些实施方案中,拮抗剂抗ALK7抗体与具有表1中公开的VH和VL对的抗体结合ALK7的相同表位。在一些实施方案中,在体外接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在一些实施方案中,在体内接触分化的白色脂肪细胞或脂肪组织。在某些实施方案中,方法在体内,例如在哺乳动物受试者(例如动物模型)中进行。在其他实施方案中,受试者是人。

[0255] 本公开提供了包括将治疗有效量的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的拮抗剂抗ALK7抗体或拮抗剂ALK7结合抗体片段)单独或与一种或多种额外疗法(例如一种或多种额外治疗剂)组合施用至患有ALK7介导的疾病和/或疾患或处于显现ALK7介导的疾病和/或疾患的风险下的受试者的方法,所述ALK7介导的疾病和/或疾患诸如是肥胖(例如腹部或内脏肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝;非酒精性脂肪肝;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和/或高胆固醇血症);心血管疾病诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和/或高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病变);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和/或癌症(例如骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌);和/或与以上疾病或疾患中的一者或多者,以及/或者与超重(例如 $\geq 25\text{kg/m}^2$ 的BMI),或与体脂过多相关的其他病症/疾患。

[0256] 还提供了本文提供的ALK7结合蛋白用于诊断监测血液或组织中的蛋白质水平(例如ALK7水平)作为临床测试程序的一部分,例如以测定给定治疗方案的功效的用途。举例来说,可通过使ALK7结合蛋白偶联于可检测物质来有助于检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和/或放射性材料。适合酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;适合荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白(phycoerythrin);发光材料的一实例包括鲁米诺(luminol);生物发光材料的实例包括荧光素酶、虫荧光素和水母素(aequorin);并且适合放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0257] 药物组合物和施用方法

[0258] 制备ALK7结合蛋白以及将ALK7结合蛋白施用至有需要的受试者的方法为本领域普通技术人员所知或容易地由本领域普通技术人员确定。ALK7结合蛋白的施用途可为例如口服、胃肠外、通过吸入或经表面。术语胃肠外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、

眼内、皮下、经直肠或经阴道施用。尽管所有这些施用形式都明确考虑为在本公开的范围
内,但施用形式的另一实例将为用于注射的溶液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注。
通常,适合药物组合物可包含缓冲剂(例如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂
(例如聚山梨醇酯)、任选的稳定剂(例如人白蛋白)等。在可与本文教导内容相容的其他方
法中,可将如本文提供的ALK7结合蛋白直接递送至具有纤维化或肿瘤的器官和/或部位,由
此增加患病组织向治疗剂的暴露。在某些实施方案中,施用直接面向气道,例如通过吸入或
鼻内施用。

[0259] 如本文所讨论,可以药学上有效量施用ALK7结合蛋白以体内治疗ALK7介导的疾病
和疾患,诸如肥胖、糖尿病、代谢疾病、血脂异常;心血管疾病、2型糖尿病、炎症或心血管疾
病、肺病、脂肪肝病、神经疾病和肝病或肾病,以及癌症。就此而言,应了解可配制所公开
ALK7结合蛋白以便有助于施用,并且促进活性剂的稳定性。本公开的药物组合物可包含药
学上可接受的无毒无菌载体,诸如生理盐水、无毒缓冲剂、防腐剂等。出于本申请的目的,缀
合或未缀合ALK7结合蛋白的药学上有效量意指足以实现与ALK7的有效结合,并且实现益
处,例如改善疾病或疾患的症状或检测物质或细胞的量。适用于本文公开的治疗方法中的
制剂描述于Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 第16版
(1980)中。

[0260] 本文提供的某些药物组合物可以可接受的剂型口服施用,所述剂型包括例如胶
囊、片剂、水性混悬剂或溶液。某些药物组合物还可通过经鼻气雾剂或通过吸入来施用。此
类组合物可采用苯甲醇或其他适合防腐剂、用以增强生物利用度的吸收促进剂、和/或其他
常规增溶剂或分散剂来制备成于盐水中的溶液。

[0261] 可与载体材料组合以产生单剂量形式的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的抗
体)的量将视所治疗受试者和特定施用模式而变化。可以单剂量、多剂量或历经确定时期以
输注形式施用组合物。还可调整剂量方案以提供最优所需响应(例如治疗或防治响应)。

[0262] 可以足以产生治疗作用的量,根据以上提及的治疗方法将本文提供的ALK7结合蛋
白施用至人或其他受试者。可以通过根据已知技术将ALK7结合蛋白与常规药学上可接受的
载体或稀释剂组合来制备的常规剂型将本文提供的ALK7结合蛋白施用至此人或其他动物。
药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特性可由它与其一起组合的活性成分的量、施用途
径和其他熟知变量决定。还可使用包含一种或多种不同ALK7结合蛋白的混合物。

[0263] ALK7结合组合物的用于治疗ALK7介导的疾病或疾患诸如肥胖、糖尿病、代谢疾病、
血脂异常;心血管疾病、2型糖尿病、炎症、或心血管疾病、肺病、脂肪肝病、神经疾病和肝病
或肾病、和/或癌症的治疗有效剂量视许多不同因素而变化,所述因素包括施用手段、靶标
部位、受试者的生理状态、受试者是人还是动物、施用的其他药物,以及治疗是防治性的还
是治疗性的。通常,受试者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可使用为
本领域普通技术人员所知的常规方法滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0264] 用以通过施用ALK7结合蛋白来改善特定疾病或疾患的症状是指可归因于施用
ALK7结合物或与施用ALK7结合物相关的任何减轻,无论是永久性的还是暂时性的、持续的
还是短暂的。

[0265] 本公开还提供了ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体在例如用于治疗、预防或改善肥
胖、糖尿病、代谢疾病、血脂异常;心血管疾病、2型糖尿病、炎症、或心血管疾病、肺病、脂肪

肝病、神经疾病和肝病或肾病、和/或癌症的药剂的制造中的用途。

[0266] 组合疗法

[0267] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段或它们的变体或衍生物)与一种或多种其他疗法组合施用。此类疗法包括额外治疗剂以及其他医学干预。可与本文提供的ALK7结合蛋白组合施用的示例性治疗剂包括但不限于抗SDI-纤维化剂、皮质类固醇、消炎剂、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、利尿剂、抗糖尿病药、免疫抑制剂、化学治疗剂、抗代谢物和/或免疫调节剂。在各种实施方案中,在手术切除/移除程序之前、期间和/或之后将ALK7结合蛋白施用至受试者。

[0268] 在一些实施方案中,ALK7结合蛋白(例如抗ALK7抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段或它们的变体或衍生物)与一种或多种(a)双胍(biguanide)(例如丁双胍(buformin)、二甲双胍(metformin)、苯乙双胍(phenformin)),(b)胰岛素,(c)生长激素抑制素(somatostatin),(d) α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如伏格列波糖(voglibose)、米格列醇(miglitol)、阿卡波糖(acarbose)),(e)DPP-IV抑制剂,诸如西格列汀(sitagliptin)、维格列汀(vildagliptin)、阿格列汀(alogliptin)、沙格列汀(saxagliptin)(例如如美国专利第6,699,871B1号中所公开),(f)LXR调节剂,(g)胰岛素促分泌剂(例如乙酰苯磺酰环己脲(acetohexamide)、磺胺丁脲(carbutamide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、格列波脲(glibornuride)、格列齐特(gliclazide)、格列美脲(glimerpiride)、格列甲脲(glipizide)、格列喹酮(gliquidine)、格列派特(glisoxepid)、格列本脲(glyburide)、格列己脲(glyhexamide)、格列平脲(glypinamide)、苯磺丁脲(phenbutamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、甲苯磺丁脲(tolbutamide)、甲磺环己脲(tolcyclamide)、那格列奈(nateglinide)和/或瑞格列奈(repaglinide)),(k)CB1抑制剂,诸如利莫那班(rimonabant)、泰伦那班(taranabant)和国际申请公布第W003/077847A2和W005/000809A1号中公开的化合物,或(i)西布曲明(sibutramine)、托吡酯(topiramate)、奥利司他(orlistat)、坤尼沙(Qnexa)、美伐他汀(mevastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、依折麦布(ezetimibe)、阿托伐他汀(atorvastatin)、纳曲酮(naltrexone)、丁氨苯丙酮(bupropion)、芬特明(phentermine)、氢氯噻嗪(hydrochlorothiazide)或洛沙坦(losartan)组合施用。

[0269] 诊断

[0270] 本公开还提供了一种可在ALK7介导的疾病和疾患(诸如肥胖(例如腹部或内脏肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和/或其他代谢疾病或疾患;脂质病症,诸如低HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂异常;脂蛋白异常;甘油三酯降低;炎症(例如肝脏炎症和/或脂肪组织炎症)、脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病;高血糖症;葡萄糖耐量受损(IGT);高胰岛素血症;高胆固醇(例如高LDL水平和/或高胆固醇血症);心血管疾病诸如包括冠心病的心脏病、充血性心力衰竭、中风、外周血管疾病、动脉粥样硬化;动脉硬化和/或高血压;综合征X;血管再狭窄;神经病变;视网膜病变;神经变性疾病;内皮功能异常、呼吸功能异常、肾病(例如肾病);胰腺炎;多囊卵巢综合征;尿酸水平升高;血色素沉着症(铁过载);黑棘皮症(皮肤上有暗斑);和/或癌症(例如骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、局限性骨髓瘤或髓外骨髓瘤)、或卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌或结肠癌);和/或与以上疾病或疾患中的一者或多者或与体脂过多相关的其

他病症/疾患。)的诊断期间使用的诊断方法,所述诊断方法涉及测量来自个体的组织或体液中ALK7蛋白的表达水平,以及将测量的表达水平与正常组织或体液中的标准ALK7表达水平进行比较,借此,相较于标准的ALK7表达水平增加指示患有可通过本文提供的ALK7结合蛋白诸如如本文提供的全长抗ALK7抗体和ALK7结合抗体片段治疗的病症。

[0271] 本文提供的ALK7结合蛋白诸如抗ALK7抗体(例如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)可用于使用为本领域技术人员所知的经典免疫组织学方法测定生物样品中的ALK7水平(参见例如Jalkanen等人,J.Cell.Biol.101:976-985(1985); Jalkanen等人,J.Cell Biol.105:3087-3096(1987))。可用于检测ALK7蛋白表达的其他基于抗体的方法包括免疫测定,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹。

[0272] 就“测定ALK7蛋白的表达水平”来说,其意指直接地(例如通过测定或估计绝对蛋白质水平)或相对地(例如通过与第二生物样品中的疾病相关的多肽水平进行比较)定性或定量测量或估计第一生物样品中ALK7蛋白的水平。可测量或估计第一生物样品中的ALK7蛋白表达水平,并且将其与标准ALK7蛋白水平进行比较,所述标准值取自从不患有病症的个体获得的第二生物样品或通过将来自不患有病症的个体群体的水平平均化来确定。如本领域中所将了解,一旦已知“标准”ALK7蛋白水平,它即可被重复用作比较标准。

[0273] 就“生物样品”来说,其意指从潜在表达ALK7的个体、细胞系、组织培养物或其他细胞来源获得的任何生物样品。用于从哺乳动物获得组织活检体和体液的方法在本领域中是已知的。

[0274] 包括ALK7结合蛋白的药盒

[0275] 本公开还提供了药盒,所述药盒包括处于适合包装中的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的抗体诸如全长ALK7抗体和ALK7结合抗体片段以及它们的变体和衍生物)以及书面材料,并且可用于进行本文所述的方法。书面材料可包括以下任何信息:使用说明书、临床研究讨论、副作用清单、科学文献参考、包装说明书材料、临床试验结果和/或这些的概述等。书面材料可指示或确定组合物的活性和/或优势,并且/或者描述给药、施用、副作用、药物相互作用或对于健康护理提供者有用的其他信息。此类信息可基于各种研究,例如使用实验动物,涉及体内模型的研究和/或基于人临床试验的研究的结果。药盒可还含有另一疗法(例如另一剂)和/或用于提供关于另一疗法(例如另一剂)的信息的书面材料,诸如上述书面材料。

[0276] 在某些实施方案中,药盒包括至少一种处于一个或多个容器中的纯化ALK7结合蛋白。在一些实施方案中,药盒含有为进行检测测定所必需以及/或者足以进行检测测定的所有组成部分,包括所有对照、关于进行检测测定的说明和/或用于分析和呈现结果的任何必需软件。

[0277] 免疫测定

[0278] 可通过本领域中已知的任何方法来测定ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的抗体和特异性结合ALK7的抗体的ACTRIIA/B结合片段以及它们的变体或衍生物)的免疫特异性结合。可使用的免疫测定包括但不限于使用诸如蛋白质印迹的技术的竞争性和非竞争性测定系统、放射免疫测定(REA)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心式”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定或蛋白A免疫测定。此类测定在本领域中是常规的和已知的(参见例

如Ausubel等人编, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley&Sons, Inc., NY) 第1卷, 其通过引用以它的整体并入本文)。

[0279] 本文提供的ALK7结合蛋白(例如特异性结合ALK7的抗体和特异性结合ALK7的抗体的ActRII受体(例如ActRIIA或ActRIIB)结合片段以及它们的变体或衍生物)可如在免疫荧光、免疫电子显微术或非免疫测定中在组织学方面用于原位检测ALK7或其保守变体或肽片段。可根据本领域中已知的方法来实现原位检测。通过采用常规实验, 本领域普通技术人员将能够确定对于每个测定有效和最优的测定条件。适于测定ALK7结合蛋白的结合特征的方法在本文中描述或另外在本领域中是已知的。被设计用于此类动力学分析的装备和软件可商购获得(例如BIACORE®, BIAevaluation®软件, GE Healthcare; KINEXA®软件, Sapidyne Instruments)。

[0280] 除非另外指示, 否则本公开的实践采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术, 其在本领域的技能的范围之内。

[0281] 以下实施例通过说明的方式而非通过限制的方式来提供。

[0282] 实施例

[0283] ***

[0284] 对具体实施方案的先前描述将如此充分地揭示本公开的一般特性以致他人可在不脱离本公开的基本构思的情况下, 在不进行过度实验下, 通过应用在本领域的技能的范围内的知识来容易地针对各种应用修改和/或改适此类具体实施方案。因此, 基于本文呈现的教导内容和指导, 此类改适和修改意图在公开的实施方案的等效方案的含义和范围内。应了解本文的措辞或术语出于描述而非限制目的, 因此本说明书的术语或措辞应由熟练技术人员根据教导内容和指导加以解释。

[0285] 本公开的宽度和范围不应由任何上述示例性实施方案限制, 而应仅根据以下权利要求和它们的等效物来限定。

[0286] 本申请中引用的所有公布、专利、专利申请和/或其他文件都出于所有目的通过引用以它们整体并入本文, 所述引用的程度就好像单独地指示出于所有目的将每个单独的公布、专利、专利申请和/或其他文件通过引用并入本文一样。

[0287] 实施例1. ALK7结合抗体的选择、表征和产生

[0288] 多轮选择程序用于选择以高亲和力结合ALK7的人IgG抗体, 此在以下详述。

[0289] 材料和方法

[0290] 使用来自Pierce的EZ-Link磺基-NHS-生物素化试剂盒使包含人ALK7-Fc的蛋白质生物素化。山羊抗人F(ab')₂κ抗体-FITC(LC-FITC)、Extravidin-PE(EA-PE)和链霉亲和素-633(SA-633)分别从Southern Biotech、Sigma和Molecular Probes获得。链霉亲和素微珠和MACS LC分离柱购自Miltenyi Biotec。

[0291] 在25℃和37℃下使用Biacore T100/T200生物传感器(Biacore/GE Healthcare)进行实验。将ALK7抗体捕集在定制FAB芯片上。以50μl/ml的流速在流动池上注射某一浓度系列的包含ALK7-Fc的蛋白质。为获得动力学速率常数, 使用BiaEvaluation软件(GE Healthcare)相对于1:1相互作用模型拟合经校正数据。通过结合速率常数的比率kd/ka来确定平衡结合常数KD。

[0292] 如先前所述使各自具有约10⁹多样性的八个原初人合成酵母文库增殖(参见例如

W009/036379;W010/105256;W012/009568)。对于前两轮选择,如所述来进行利用Miltenyi MACs系统的磁珠分选技术(参见例如Siegel等人,J.Immunol.Meth.286(1-2):141-153(2004))。简要来说,将酵母细胞(约 10^{10} 个细胞/文库)与3ml 10nM生物素化的包含ALK7-Fc的蛋白质一起在室温下在FACS洗涤缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS)/0.1%牛血清白蛋白(BSA))中孵育15分钟。在用50ml冰冷洗涤缓冲液洗涤一次之后,将细胞集结块再悬浮于40mL洗涤缓冲液中,并且将链霉亲和素微珠(500 μ l)添加至酵母中,并且在4℃下孵育15分钟。接着,使酵母集结,再悬浮于5mL洗涤缓冲液中,并且上样于Miltenyi LS柱上。在上样5mL之后,用3ml FACS洗涤缓冲液将柱洗涤3次。接着将柱从磁场中移除,并且用5mL生长培养基洗脱酵母,接着使其生长过夜。使用流式细胞计量术进行之后各轮分选。使约 1×10^8 个酵母集结,用洗涤缓冲液洗涤三次,并且与递减浓度的生物素化的包含ALK7-Fc的蛋白质(100至1nM)一起在室温下在平衡条件下孵育。接着洗涤酵母两次,并且用LC-FITC(1:100稀释)以及SA-633(1:500稀释)或EA-PE(1:50稀释)二级试剂在4℃下染色15分钟。在用冰冷洗涤缓冲液洗涤两次之后,将细胞集结块再悬浮于0.4mL洗涤缓冲液中,并且转移至带滤网盖的分选管中。使用FACS ARIA分选器(BD Biosciences)进行分选,并且指定分选门以相对于背景对照选择特异性结合剂。后续各轮选择用于利用来自CHO细胞的可溶性膜蛋白来降低非特异性试剂结合剂的数目(参见例如W014/179363以及Xu等人,Protein Eng.Des.Sel.26(10):663-670(2013)),并且使用包含ALK7-Fc的蛋白质来鉴定对ALK7具有改善的亲力的结合剂。在末轮分选之后,将酵母铺板,并且挑选单个菌落以进行表征和对用于亲和力成熟的克隆进行指定。

[0293] 亲和力成熟

[0294] 利用三种成熟策略来进行原初克隆的结合优化:轻链多样化;CDRH和/CDRH2的多样化;以及进行依序VH和VL诱变。

[0295] 轻链多样化:重链质粒是提取的原初输出物(以上描述),并且转化至具有 1×10^6 的多样性的轻链文库中。如上所述以一轮MACS分选和两轮FACS分选进行选择,对于相应各轮,使用10nM或1nM生物素化ALK7-Fc抗原。

[0296] CDRH1和CDRH2选择:将来自轻链多样化程序选择的克隆的CDRH3重组至预先制备的具有 1×10^8 的多样性的含有CDRH1和CDRH2变体的文库中,并且使用ALK7进行选择,如以上所描述。通过将生物素化抗原-抗体酵母复合物与未生物素化抗原一起孵育不同时间量来施加亲和力压力以选择最高亲和力抗体。

[0297] VHmut/VKmut选择:通过对重链和/或轻链进行基于易出错PCR的诱变来使由CDRH1和CDRH2选择程序获得的克隆经受额外各轮亲和力成熟。大体上如以上实施例2中所述,但在对于所有选择轮都添加采用FACS分选的情况下,使用ALK7作为抗原进行选择。降低抗原浓度,并且增加冷抗原竞争时间以进一步加压来获得最优亲和力。

[0298] 表面等离子体共振分析-

[0299] 在25和37℃下使用Biacore T100/T200生物传感器(Biacore/GE Healthcare)进行实验。将ALK7抗体捕集在定制FAB芯片上。以50 μ l/ml的流速在流动池上注射某一浓度系列的包含ALK7-Fc的蛋白质。为获得动力学速率常数,使用BiaEvaluation软件(GE Healthcare)相对于1:1相互作用模型拟合经校正数据。通过结合速率常数的比率 k_d/k_a 来确定平衡结合常数 K_D 。

[0300] 抗体产生和纯化

[0301] 为产生足量的所选抗体用于进一步表征,使酵母克隆生长至饱和,接着在30℃下在振荡下诱导48小时。在诱导之后,使酵母细胞集结,并且收集上清液以进行纯化。使用蛋白A柱纯化IgG,并且用pH 2.0乙酸洗脱。通过木瓜蛋白酶消化来产生Fab片段,并且经KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences) 纯化。

[0302] ForteBio K_D 测量

[0303] 大体上如先前所述进行所选抗体的ForteBio亲和力测量(参见例如Estep等人, Mabs, 5 (2):270-278 (2013))。简要说,通过将IgG在线上样于AHQ传感器上来进行ForteBio亲和力测量。使传感器在测定缓冲液中离线平衡30分钟,接着在线监测60秒以建立基线。使经IgG上样的传感器暴露于100nM抗原5分钟,之后,将它们转移至测定缓冲液中,持续5分钟以进行解离速率测量。使用1:1结合模型分析动力学。

[0304] Octet Red384表位划分/配体阻断

[0305] 使用标准夹心形式交叉阻断测定进行所选抗体的表位划分/配体阻断。将对照靶标IgG上样于AHQ传感器上,并且传感器上未被占据的Fc结合位点用无关人IgG1抗体封闭。接着使传感器暴露于100nM靶标抗原,随后暴露于第二抗靶标抗体或配体。使用ForteBio的数据分析软件7.0处理数据。在抗原缔合之后由第二抗体或配体达成的额外结合指示未被占据的表位(非竞争剂),而不结合指示表位阻断(竞争剂或配体阻断)。

[0306] 尺寸排阻色谱法

[0307] TSKgel SuperSW mAb HTP柱(22855)用于在0.4毫升/分钟下以6分钟/运行的循环时间对酵母产生的mAb进行快速SEC分析。200mM磷酸钠和250mM氯化钠用作流动相。

[0308] 动态扫描荧光测定法

[0309] 将10uL 20x Sypro Orange添加至20uL 0.2-1mg/mL mAb或Fab溶液中。RT-PCR仪(BioRad CFX96 RT PCR)用于使样品板温度在0.5℃增量下从40℃匀变至95℃,其中在每个温度下平衡2分钟。原始数据的一阶导数的负数用于求出 T_m 。

[0310] 基于前述分析,确认了具有优选特征的原初ActRII结合抗体的序列,并且选择用于使用上述成熟策略进行结合优化。

[0311] 产生的示例性优化ActRII结合蛋白是表1中呈现的M01、N01、P01和Q01。

[0312] 实施例2.ALK7结合抗体的表征

[0313] 进一步通过序列分析、SPR分析和基于细胞的脂解抑制测定分析来表征根据先前实施例产生的示例性ALK7结合蛋白。

[0314] 根据实施例1中所述的方法产生的示例性ALK7结合抗体的序列呈现于表1中(示例性CDR序列加下划线)。

[0315] 表1:示例性ALK7结合蛋白

[0316] M01

[0317]

VH FR1	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO:6)	
VH CDR1	GGSISSSAY (SEQ ID NO:1)	
VH FR2	YWAWIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:7)	
VH CDR2	SIYLSGSTTYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	
VH FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:8)	
VH CDR3	DGRYQSRSPDYYYGMDV (SEQ ID NO:3)	
VH FR4	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:9)	
VH ABR	ABR1: GSISSSAYYWA (SEQ ID NO:73)	ABR2: SIYLSGSTTYNPSLKS (SEQ ID NO:74) 或 WIGSIYLSGSTTY (SEQ ID NO:69)
	ABR3: ARDGRYQSRSPDYYYGMDV (SEQ ID NO:75)或 RDGRYQSRSPDYYYGMDV (SEQ ID NO:70)	
VH DNA	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGA AGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTG GTGGCTCCATCAGCAGTAGTGCTTACTACTGGGCGTGGA TCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG AGTATCTATTTGAGTGGGAGCACCCTTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCG CAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGACGGCAGA TACCAAAGCAGGTCGCCGGATTACTATTACGGTATGGAT GTCTGGGGCCAGGGAACAACCTGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)	
VH 蛋白	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSAYYWAWIRQ PPGKGLEWIGSIYLSGSTTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDGRYQSRSPDYYYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:4)	
VL FR1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC (SEQ ID NO:15)	
VL CDR1	RASQSVSDNYLA (SEQ ID NO:10)	
VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:16)	
VL CDR2	GASNIAT (SEQ ID NO:11)	
VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:17)	
VL CDR3	ASVFSYPFT (SEQ ID NO:12)	
VL FR4	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)	
VL ABR	ABR1: QSVSDNYLA (SEQ ID NO:71)	ABR2: LLIYGASNIAT (SEQ ID NO:72)
	ABR3: ASVFSYPF (SEQ ID NO:87)	
VL DNA	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG	

[0318]

	TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCGACAACCTACTTAGCCTGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTG CATCCAACATCGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGCG TCGGTGTTCAAGTTACCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACC AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:14)
VL 蛋白	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSDNYLAWYQQK</u> PGQAPRLLIYGASNIATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYC <u>ASVFSYPFT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)

[0319] N02

[0320]

VH FR1	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO:24)	
VH CDR1	GGSISSSAY (SEQ ID NO:19)	
VH FR2	YWAWIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:25)	
VH CDR2	SIYLSGSTTYNPSLKS (SEQ ID NO:20)	
VH FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:26)	
VH CDR3	DGRYQSRSPDYYYGMDV (SEQ ID NO:21)	
VH FR4	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:27)	
VH ABR	ABR1: GSISSSAYYWA (SEQ ID NO:76)	ABR2: SIYLSGSTTYNPSLKS (SEQ ID NO:77) 或 WIGSIYLSGSTTY (SEQ ID NO:88)
	ABR3: ARDGRYQSRSPDYYYGMDV (SEQ ID NO:78)或 RDGRYQSRSPDYYYGMDV (SEQ ID NO:89)	
VH DNA	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGA AGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTG GTGGCTCCATCAGCAGTAGTGCTTACTACTGGGCGTGGA TCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG AGTATCTATTTGAGTGGGAGCACCCTTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCG CAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGACGGCAGA TACCAAAGCAGGTCGCCGGATTACTATTACGGTATGGAT GTCTGGGGCCAGGGAACAACCTGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:23)	
VH 蛋白	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSAYYAWIRQPPGKGLEWIG SIYLSGSTTYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR DGRYQSRSPDYYYGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)	
VL FR1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC (SEQ ID NO:33)	
VL CDR1	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:28)	
VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:34)	
VL CDR2	GASSTAY (SEQ ID NO:29)	
VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:35)	

[0321]

VL CDR3	QQLVAYPFT (SEQ ID NO:30)	
VL FR4	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)	
VL ABR	ABR1: QSVSSSYLA (SEQ ID NO:90)	ABR2: LLIYGASS TAY (SEQ ID N O:91)
	ABR3: QQLVAYPF (SEQ ID NO: 92)	
VL DNA	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCAG TCAGAGTGTTAGCTCCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGC ATCCAGCACCGCCTACGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTG GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAG CAGTTGGTTGCGTACCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACC AAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:32)	
VL 蛋白	EIVLTQSPGTL ~~SL~~ SPGERATL ~~SCR~~ ASQSVSSSYLA ~~WY~~ QQKP GQAPRLLIYG ~~AS~~ TAYGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQLVAYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)	

[0322] P03

[0323]

VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFA (SEQ ID NO:42)	
VH CDR1	GYNMH (SEQ ID NO:37)	
VH FR2	WVRQAPGQGLEWVGII (SEQ ID NO:43)	
VH CDR2	NPNSGW (SEQ ID NO:38)	
VH FR3	TNYAQKFQGRVTMTRDTSVSAAYMELSRRLSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO:44)	
VH CDR3	DPVGARYEVFDY (SEQ ID NO:39)	
VH FR4	WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:45)	
VH ABR	ABR1: YTFAGYNMH (SEQ ID NO:79)	ABR2: IINPNSGWTNYAQKFQG (SEQ ID NO:80) 或 WVGIIINPNSGWTNYA (SEQ ID NO:93)
	ABR3: ARDPVGARYEVFDY (SEQ ID NO: 81)或 RDPVGARYEVFDY (SEQ ID NO:94)	
VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCGCTGGCTACAATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGGAATTATCAACCCTAACAGTGGTTGGACAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCGTCAGCGCAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGACCCTGTCGGAGCAAGATACGAGGTTTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:41)	
VH 蛋白	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFAGYNMHWVRQAPGQGLEWVVGIIINPNSGWTNYAQKFQGRVTMTRDTSVSAAYMELSRRLSDDTAVYYCARDPVGARYEVFDYWGQGT	

[0324]

	LTVSS (SEQ ID NO:40)	
VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:51)	
VL CDR1	QASQSVSSNLA (SEQ ID NO:46)	
VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:52)	
VL CDR2	GASTIAT (SEQ ID NO:47)	
VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:53)	
VL CDR3	QQAYAFPLT (SEQ ID NO:48)	
VL FR4	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:54)	
VL ABR	ABR1: QSVSSNLA (SEQ ID NO:95)	ABR2: LLIYGAST IAT (SEQ ID NO:96)
	ABR3: QQAYAFPL (SEQ ID NO:97)	
VL DNA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCCAAGCCAG TCAGAGTGTTAGCTCCAACCTTAGCCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAT CCACCATCGCCACCGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCA GGCGTATGCGTTCCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAA GGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:50)	
VL 蛋白	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>QASQSVSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTIAT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <u>QQAYAFPLT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:49)	

[0325] Q04

[0326]

VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFA (SEQ ID NO:60)	
VH CDR1	GYNMH (SEQ ID NO:55)	
VH FR2	WVRQAPGQGLEWVGII (SEQ ID NO:61)	
VH CDR2	NPNSGW (SEQ ID NO:56)	
VH FR3	TNYAQKFQGRVTMTRDTSVSAAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO:62)	
VH CDR3	DPVGARYEVFDY (SEQ ID NO:57)	
VH FR4	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:63)	
VH ABR	ABR1: YTFAGYNMH (SEQ ID NO:82)	ABR2: IINPNSGWTNYAQKFQG (SEQ ID NO:83)或 WVGIIINPNSGWTNYA (SEQ ID NO:98)
	ABR3: ARDPVGARYEVFDY (SEQ ID NO:84)或 RDPVGARYEVFDY (SEQ ID NO:99)	
VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCGCTGGCTACAATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGGAATTATCAACCCTAACAGTGGTTGGACAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCGTC	

[0327]

	AGCGCAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGACCCTGTCTGGAGCAAGATACGAGGTTTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:59)	
VH 蛋白	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFAGYNMHWVRQAPGQGLEWVGIINPNSGWTNYAQKFQGRVTMTRDTSVSAAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDPVGARYEVFDYWGQGT LTVVSS (SEQ ID NO:58)	
VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:51)	
VL CDR1	KASQSVSSNLA (SEQ ID NO:64)	
VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:52)	
VL CDR2	GASTRAT (SEQ ID NO:65)	
VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO:53)	
VL CDR3	QQAVKFPLT (SEQ ID NO:66)	
VL FR4	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:54)	
VL ABR	ABR1: QSVSSNLA (SEQ ID NO:100)	ABR2: LLIYGAST RAT (SEQ ID NO:101)
	ABR3: QQAVKFPL (SEQ ID NO:102)	
VL DNA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAAAGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCCGCGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGGCTGTGAAGTTCCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO:68)	
VL 蛋白	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQSVSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <u>QQAVKFPLT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:67)	

[0328] SPR (基于BIAcore™的分析) 和基于细胞的脂解抑制测定用于更充分表征表1中所述的一组示例性ALK7结合蛋白。

[0329] 表面等离子体共振分析-

[0330] 在25和37℃下使用Biacore T100/T200生物传感器 (Biacore/GE Healthcare) 进行实验。将ALK7抗体捕集在定制FAB芯片上。以50μl/ml的流速在流动池上注射某一浓度系列的包含ALK7-Fc的蛋白质。为获得动力学速率常数, 使用BiaEvaluation软件 (GE Healthcare) 相对于1:1相互作用模型拟合经校正数据。通过结合速率常数的比率kd/ka来确定平衡结合常数KD。

[0331] 脂解抑制测定

[0332] 脂解是细胞内甘油三酯水解成甘油和游离脂肪酸。甘油和游离脂肪酸接着释放至血流或培养基中。尽管脂解在基本上所有细胞中发生, 但它在白色和棕色脂肪细胞中最丰

富。使3T3-L1细胞(由ATCC提供;ATCC®CL-173™)在含有10%牛血清(Life Technologies;16170-060)的杜贝卡氏改良依格培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(ATCC;ATCC®30-2002™)中生长直至达到汇合。为诱导分化,在汇合后2天,用含有10%胎牛血清(Life Technologies;10082147)、地塞米松(Sigma,D8893)、IBMX(Sigma,I7018)和胰岛素(Sigma,I0516)的新鲜杜贝卡氏改良依格培养基(ATCC;ATCC®30-2002™)替换培养基,持续2周。如通过显微术确定的脂滴在细胞上的积累用于确认完全分化成成熟脂肪细胞。将脂肪细胞用媒介物(PBS)、活化素B(50ng/ml)处理,或用活化素B(50ng/ml)和ALK7抗体(5μg/ml)共处理过夜。将细胞用PBS洗涤两次,并且与脂解测定缓冲液(由Abcam提供;ab185433)一起孵育。在3小时之后收集脂解测定缓冲液,并且根据制造商说明书(Abcam;ab185433)测量甘油水平。

[0333] 示例性ALK7结合蛋白的SPR的结果呈现于表2中,并且基于细胞的脂解抑制测定的结果呈现于表2中。

[0334] 表2:示例性ALK7结合蛋白的结合表征和活性

	与包含人 ALK7-EK-Fc 的蛋白质的结合		
	$k_{\text{结合}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{解离}}(\text{s}^{-1})$	$K_D(\text{nM})$
[0335] M01	4.31×10^4	4.32×10^{-5}	1.00
N02	5.98×10^4	5.20×10^{-5}	0.87
P03	3.66×10^4	1.43×10^{-5}	0.39
Q04	3.31×10^4	4.70×10^{-5}	1.42

[0336] ALK7信号传导被认为会阻抑脂解,并且因此导致脂肪积累在脂肪细胞和脂肪组织中。在基于细胞的脂解抑制测定中评估抗体M01、N02、P03和Q04干扰ALK7介导的脂解抑制的能力。

[0337] 人ALK7(SEQ ID NO:85)和大鼠ALK7(SEQ ID NO:86)的细胞外结构域共有97%序列同一性。使用SPR测定抗体M01、N02、P03和Q04与人ALK7和大鼠ALK7的结合。

[0338] 实施例3. ALK7 Ab对肥胖小鼠的脂肪过多和瘦性体质的影响

[0339] 探究了若干人单克隆ALK7抗体(ALK7 mAb)在膳食诱发的肥胖的鼠模型中对脂肪和瘦性组织质量的影响。

[0340] 使用NMR评估雄性小鼠($n=8/\text{组}$)在基线时的脂肪和瘦性肌肉量。接着将小鼠分成不同治疗组:1)喂以标准食物膳食(SD)并用TBS媒介物每周两次皮下治疗的小鼠;2)喂以高脂肪膳食(HFD)并用TBS媒介物每周两次皮下治疗的小鼠;3)用10mg/kg的ALK7 mAb M01每周两次皮下治疗的HDF小鼠;4)用10mg/kg的ALK7 mAb N01每周两次皮下治疗的HDF小鼠;5)用10mg/kg的ALK7 mAb P01每周两次皮下治疗的HDF小鼠;和6)用10mg/kg的ALK7 mAb Q01每周两次皮下治疗的HDF小鼠。在三周之后,再次使小鼠经受全身NMR扫描以评估脂肪和瘦性组织质量的量,并且将这些测量结果与脂肪和瘦性肌肉的基线量进行比较。

[0341] 实施例4. ALK7 Ab对已确定肥胖的小鼠的影响

[0342] 这个实施例描述对人单克隆ALK7抗体(ALK7 mAb)关于已确定肥胖的小鼠的体重、脂肪和瘦性组织质量分布的治疗潜力的探究。为测试ALK7抗体的潜力,将小鼠(C57BL/6品系)基于体重随机化,并且用高脂肪膳食(HFD)喂食直至每只小鼠的体重在研究基线时达到

约35克。用标准食物膳食 (SD) 对对照小鼠 (n=5) 喂食。接着将小鼠 (n=5-9/组) 分成不同治疗组: 1) 用TBS媒介物每周两次皮下治疗的SD小鼠 (即用SD喂食的小鼠); 2) 用TBS媒介物每周两次皮下治疗的HFD小鼠 (即用HFD喂食的小鼠); 3) 用1mg/kg的ALK7 mAb M01每周两次皮下治疗的HDF小鼠; 4) 用3mg/kg的ALK7 mAb N01每周两次皮下治疗的HDF小鼠; 5) 用10mg/kg的ALK7 mAb P01每周两次皮下治疗的HDF小鼠; 和5) 用10mg/kg的ALK7 mAb Q01每周两次皮下治疗的HDF小鼠。使小鼠经受全身NMR扫描以评估在基线、3周和6周时间点时的脂肪和瘦性组织质量的量。在研究期间一周两次使用称重秤记录体重。

序列表

<110> 艾科赛扬制药股份有限公司 (ACCELERON PHARMA INC.)

<120> ALK7结合蛋白及其用途

<130> APH-00725

<140>

<141>

<150> 62/854,619

<151> 2019-05-30

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 1

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ala Tyr

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 2

Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 3

Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 5

```

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtgctt actactgggc gtggatccgc      120
cagccccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct atttgagtgg gagcaccact      180
tacaaccgtt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccagagac      300
ggcagatacc aaagcaggtc gccggattac tattacggtg tggatgtctg gggccaggga      360
acaactgtca cgtctcctc a                                     381

```

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 6

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 7

Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 8

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 11

Gly Ala Ser Asn Ile Ala Thr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 12

Ala Ser Val Phe Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Asn

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

〈223〉 人工序列的描述:合成肽

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 17

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 19

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ala Tyr

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 20

Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成肽
 <400> 21
 Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val
 <210> 22
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <400> 22
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 23
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

$\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 23

cagctgcagc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagc	agtagtgctt	actactgggc	gtggatccgc	120
cagccccag	ggaaggggct	ggagtggatt	gggagtatct	atttgagtgg	gagcaccact	180
tacaaccctg	ccctcaagag	tcgagtcacc	atatccgtag	acacgtccaa	gaaccagttc	240
tccctgaagc	tgagttctgt	gaccgccgca	gacacggcgg	tgtactactg	cgccagagac	300
ggcagatacc	aaagcaggtc	gccggattac	tattacggta	tggatgtctg	gggccaggga	360
acaactgtca	ccgtctcctc	a				381

 $\langle 210 \rangle$ 24

<211> 25

<212> PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列的描述:合成肽

<400> 24

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser							
			20					25							

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列的描述:合成肽

<400> 25

Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15
Gly

<210> 26

32

<212> PRT

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列的描述:合成多肽

<400> 26

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1	5	10	15												
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
		20						25					30		

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 27

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5				10		

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 28

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5				10			

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 29

Gly	Ala	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
1				5		

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 30

Gln	Gln	Leu	Val	Ala	Tyr	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 31

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70				75						80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Leu	Val	Ala	Tyr	Pro
			85					90						95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 32

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 32

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gagccagtc	gagtgttagc	tccagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatcca	gcaccgccta	cggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgt	ttactgtcag	cagttggttg	cgtacccttt	cacttttggc	300
ggagggacca	aggttgagat	caaa				324

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 34

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 35

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 36

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 37

Gly Tyr Asn Met His

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 38

Asn Pro Asn Ser Gly Trp

1 5

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 39

Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Gly Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Trp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Val Ser Ala Ala Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 41			
<211> 363			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸			
<400> 41			
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc			60
tcctgcaagg cttctggata caccttcgct ggctacaata tgcactgggt gcgacaggcc			120
cctggacaag ggcttgagtg ggtgggaatt atcaacccta acagtggttg gacaaactat			180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccgtcag cgcagcctac			240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcggtgt actactgcgc cagagaccct			300
gtcggagcaa gatacgaggt ttctgattac tggggacagg gtacattggt caccgtctcc			360
tca			363
<210> 42			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工序列的描述:合成多肽			
<400> 42			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala			
20 25 30			
<210> 43			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工序列的描述:合成肽			
<400> 43			

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly Ile Ile
1 5 10 15

<210> 44

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 44

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
1 5 10 15

Thr Ser Val Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 20 25 30

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35 40

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 46

Gln Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 47

Gly Ala Ser Thr Ile Ala Thr

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 48

Gln Gln Ala Tyr Ala Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 49

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Ile Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ala Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 50

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 50
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgcc aagccagtca gagggttagc tccaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca tcgccaccgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gcgtatgcgt tccctctcac ttttggcgga 300
 gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 51

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 51

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 52

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 53

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 54

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 55

Gly Tyr Asn Met His

1 5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 56

Asn Pro Asn Ser Gly Trp

1 5

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 57

Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 58

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

<210> 59

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 59

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccttcgct	ggctacaata	tgactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagt	ggtgggaatt	atcaacccta	acagtgggtg	gacaaactat	180
gcacagaagt	tccagggcag	ggtcaccatg	accagggaca	cgtccgtcag	cgcagcctac	240
atggagctga	gcaggctgag	atctgacgac	acggcggtgt	actactgcgc	cagagaccct	300
gtcggagcaa	gatacgaggt	tttcgattac	tggggacagg	gtacattggt	caccgtctcc	360
tca						363

<210> 60

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala
 20 25 30

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 61

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly Ile Ile
1 5 10 15

<210> 62

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 62

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
1 5 10 15
Thr Ser Val Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 20 25 30
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35 40

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 63

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 64

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 65

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 66

Gln Gln Ala Val Lys Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 67

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Val Lys Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 68

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 68

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca aagccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacc gcgccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gctgtgaagt tccctctcac ttttggcgga 300
 gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 69

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr
 1 5 10

<210> 70

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 70

Arg Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 71

Gln Ser Val Ser Asp Asn Tyr Leu Ala

1 5

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 72

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Ile Ala Thr

1 5 10

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 73

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ala Tyr Tyr Trp Ala

1 5 10

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 74

Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 75

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 75

Ala Arg Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 76

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ala Tyr Tyr Trp Ala
1 5 10

<210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 77

Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 78

Ala Arg Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 79

Tyr Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Met His

1 5

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 80

Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Trp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 81

Ala Arg Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 82

Tyr Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Met His

1 5

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 83

Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Trp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 84
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成肽
 <400> 84
 Ala Arg Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 85
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 85
 Met Thr Arg Ala Leu Cys Ser Ala Leu Arg Gln Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ala Glu Leu Ser Pro Gly Leu Lys Cys Val Cys Leu Leu
 20 25 30
 Cys Asp Ser Ser Asn Phe Thr Cys Gln Thr Glu Gly Ala Cys Trp Ala
 35 40 45
 Ser Val Met Leu Thr Asn Gly Lys Glu Gln Val Ile Lys Ser Cys Val
 50 55 60
 Ser Leu Pro Glu Leu Asn Ala Gln Val Phe Cys His Ser Ser Asn Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Lys Thr Glu Cys Cys Phe Thr Asp Phe Cys Asn Asn Ile Thr
 85 90 95
 Leu His Leu Pro Thr Ala Ser Pro Asn Ala Pro Lys Leu Gly Pro Met
 100 105 110
 Glu Leu Ala Ile Ile Ile Thr Val Pro Val Cys Leu Leu Ser Ile Ala
 115 120 125
 Ala Met Leu Thr Val Trp Ala Cys Gln Gly Arg Gln Cys Ser Tyr Arg
 130 135 140
 Lys Lys Lys Arg Pro Asn Val Glu Glu Pro Leu Ser Glu Cys Asn Leu
 145 150 155 160
 Val Asn Ala Gly Lys Thr Leu Lys Asp Leu Ile Tyr Asp Val Thr Ala
 165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala			
180	185	190	
Arg Thr Ile Val Leu Gln Glu Ile Val Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu			
195	200	205	
Val Trp His Gly Arg Trp Cys Gly Glu Asp Val Ala Val Lys Ile Phe			
210	215	220	
Ser Ser Arg Asp Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln			
225	230	235	240
Thr Val Met Leu Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp			
245	250	255	
Asn Lys Asp Asn Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Glu Tyr			
260	265	270	
His Glu Gln Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Asn Arg Asn Ile Val Thr			
275	280	285	
Val Ala Gly Met Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ile Ala Ser Gly Leu Ala			
290	295	300	
His Leu His Met Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala			
305	310	315	320
His Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Cys Glu Thr			
325	330	335	
Cys Ala Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Lys His Asp Ser Ile Leu			
340	345	350	
Asn Thr Ile Asp Ile Pro Gln Asn Pro Lys Val Gly Thr Lys Arg Tyr			
355	360	365	
Met Ala Pro Glu Met Leu Asp Asp Thr Met Asn Val Asn Ile Phe Glu			
370	375	380	
Ser Phe Lys Arg Ala Asp Ile Tyr Ser Val Gly Leu Val Tyr Trp Glu			
385	390	395	400
Ile Ala Arg Arg Cys Ser Val Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu			
405	410	415	
Pro Tyr Tyr Asp Met Val Pro Ser Asp Pro Ser Ile Glu Glu Met Arg			
420	425	430	
Lys Val Val Cys Asp Gln Lys Phe Arg Pro Ser Ile Pro Asn Gln Trp			
435	440	445	
Gln Ser Cys Glu Ala Leu Arg Val Met Gly Arg Ile Met Arg Glu Cys			
450	455	460	
Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys			
465	470	475	480
Thr Ile Ser Gln Leu Cys Val Lys Glu Asp Cys Lys Ala			

485	490
<210> 86	
<211> 493	
<212> PRT	
<213> 褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)	
<400> 86	
Met Thr Pro Ala Arg Arg Ser Ala Leu Ser Leu Ala Leu Leu Val	
1 5 10 15	
Ala Leu Ala Ser Asp Leu Ala Ala Gly Leu Lys Cys Val Cys Leu Leu	
20 25 30	
Cys Asp Ser Ser Asn Phe Thr Cys Gln Thr Glu Gly Ala Cys Trp Ala	
35 40 45	
Ser Val Met Leu Thr Asn Gly Lys Glu Gln Val Ser Lys Ser Cys Val	
50 55 60	
Ser Leu Pro Glu Leu Asn Ala Gln Val Phe Cys His Ser Ser Asn Asn	
65 70 75 80	
Val Thr Lys Thr Glu Cys Cys Phe Thr Asp Phe Cys Asn Asn Ile Thr	
85 90 95	
Gln His Leu Pro Thr Ala Ser Pro Asp Ala Pro Arg Leu Gly Pro Thr	
100 105 110	
Glu Leu Thr Val Val Ile Thr Val Pro Val Cys Leu Leu Ser Ile Ala	
115 120 125	
Ala Met Leu Thr Ile Trp Ala Cys Gln Asp Arg Gln Cys Thr Tyr Arg	
130 135 140	
Lys Thr Lys Arg His Asn Val Glu Glu Pro Leu Ala Glu Tyr Ser Leu	
145 150 155 160	
Val Asn Ala Gly Lys Thr Leu Lys Asp Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Ala	
165 170 175	
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala	
180 185 190	
Arg Thr Ile Val Leu Gln Glu Ile Val Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu	
195 200 205	
Val Trp His Gly Arg Trp Cys Gly Glu Asp Val Ala Val Lys Ile Phe	
210 215 220	
Ser Ser Arg Asp Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln	
225 230 235 240	
Thr Val Met Leu Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp	
245 250 255	
Asn Lys Asp Asn Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Glu Tyr	

260	265	270
His Glu Gln Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Asn Arg Asn Ile Val Thr		
275	280	285
Val Ala Gly Met Val Lys Leu Ala Leu Ser Ile Ala Ser Gly Leu Ala		
290	295	300
His Leu His Met Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala		
305	310	315
His Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Cys Asp Thr		
325	330	335
Cys Ala Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Lys His Asp Ser Ile Met		
340	345	350
Asn Thr Ile Asp Ile Pro Gln Asn Pro Lys Val Gly Thr Lys Arg Tyr		
355	360	365
Met Ala Pro Glu Met Leu Asp Asp Thr Met Asn Val Asn Ile Phe Glu		
370	375	380
Ser Phe Lys Arg Ala Asp Ile Tyr Ser Val Gly Leu Val Tyr Trp Glu		
385	390	395
Ile Ala Arg Arg Cys Ser Val Gly Gly Leu Val Glu Glu Tyr Gln Leu		
405	410	415
Pro Tyr Tyr Asp Met Val Pro Ser Asp Pro Ser Ile Glu Glu Met Arg		
420	425	430
Lys Val Val Cys Asp Gln Lys Leu Arg Pro Asn Leu Pro Asn Gln Trp		
435	440	445
Gln Ser Cys Glu Ala Leu Arg Val Met Gly Arg Ile Met Arg Glu Cys		
450	455	460
Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys		
465	470	475
Thr Ile Ser Gln Leu Cys Val Lys Glu Asp Cys Lys Ala		
485	490	

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 87

Ala Ser Val Phe Ser Tyr Pro Phe

1

5

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 88

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Thr Tyr

1 5 10

<210> 89

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 89

Arg Asp Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 90

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 91

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Thr Ala Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 92

Gln Gln Leu Val Ala Tyr Pro Phe

1 5

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 93

Trp Val Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Trp Thr Asn Tyr Ala

1 5 10 15

<210> 94

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 94

Arg Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 95

Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 96

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Ile Ala Thr

1 5 10

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 97

Gln Gln Ala Tyr Ala Phe Pro Leu

1 5

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 98

Trp Val Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Trp Thr Asn Tyr Ala

1 5 10 15

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 99

Arg Asp Pro Val Gly Ala Arg Tyr Glu Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 100

Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成肽
<400> 101
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5 10
<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成肽
<400> 102
Gln Gln Ala Val Lys Phe Pro Leu
1 5
<210> 103
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成6xHis标签
<400> 103
His His His His His His
1 5