



(21) 申请号 201680033053.0

A61P 13/12 (2006.01)

(22) 申请日 2016.04.06

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103221426 A, 2013.07.24

申请公布号 CN 107709357 A

WO 2012088302 A2, 2012.06.28

(43) 申请公布日 2018.02.16

Shen 等. Decrypting the role of Cripto in tumorigenesis. 《The Journal of Clinical Investigation》. 2003, 第112卷 (第4期),

(30) 优先权数据

Zhu 等. Inhibin α -subunit N-terminal Extension Interacts with ALK4 and Disrupts the Activin/ActRIIB/ALK4

62/143579 2015.04.06 US

Complex. 《Biology of Reproduction》. 2010, 第83卷 (第S1期),

62/220836 2015.09.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Andersson 等. Growth differentiation factor 11 signals through the

2017.12.06

transforming growth factor- β receptor

(86) PCT国际申请的申请数据

ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. 《EMBO reports》. 2006, 第7卷 (第8期),

PCT/US2016/026269 2016.04.06

(87) PCT国际申请的公布数据

Tsuchida 等. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. 《Endocrine Journal》. 2007, 第55卷 (第1期),

WO2016/164497 EN 2016.10.13

(73) 专利权人 阿塞勒隆制药公司

Tsuchida 等. Activin signaling as an emerging target for therapeutic

地址 美国麻萨诸塞州

interventions. 《Cell Communication and Signaling》. 2009, 第7卷 (第15期),

(72) 发明人 R. 库马 A. 格林伯格 D.S. 萨科

审查员 郝攀

R.S. 皮尔萨尔 R. 卡斯通瓜伊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 黄登高 黄希贵

(51) Int. Cl.

C07K 14/71 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/06 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

权利要求书2页 说明书100页

序列表50页 附图31页

(54) 发明名称

ALK4:ActRIIB异多聚体和其用途

(57) 摘要

在某些方面, 本公开内容提供了可溶性异聚多肽复合物, 其包含ALK4受体的细胞外结构域和ActRIIB的细胞外结构域。在某些方面, 这样的可溶性ALK4:ActRIIB复合物可用于调节(促进或抑

制) 组织或细胞的生长, 包括例如, 肌肉、骨、软骨、脂肪、神经组织、肿瘤和/或癌细胞。在某些方面, 这样的ALK4:ActRIIB复合物可用于改进肌肉形成、骨形成、代谢参数和与这些组织、细胞网络、肾和内分泌系统有关的病症。

1. 重组异二聚体, 其由ALK4-Fc融合多肽和ActRIIB-Fc融合多肽组成:

其中所述ALK4-Fc融合多肽包含具有与以下多肽相同的氨基酸序列的ALK4多肽:

- a) 以SEQ ID NO: 9的氨基酸24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34的任一个开始, 和
- b) 以SEQ ID NO: 9的氨基酸101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126的任一个结束;

其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含具有与以下多肽相同的氨基酸序列的ActRIIB多肽:

- a) 以SEQ ID NO: 1的氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的任一个开始, 和
- b) 以SEQ ID NO: 1的氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134的任一个结束;

其中所述ALK4-Fc融合多肽和所述ActRIIB-Fc融合多肽各自还包含Fc免疫球蛋白结构域。

2. 权利要求1的异二聚体, 其中所述ALK4多肽包含与SEQ ID NO: 9的氨基酸34-101相同的氨基酸序列。

3. 权利要求1的异二聚体, 其中所述ALK4多肽包含与SEQ ID NO: 10相同的氨基酸序列。

4. 权利要求1-3中任一项的异二聚体, 其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO: 1的氨基酸25-131相同的氨基酸序列。

5. 权利要求4的异二聚体, 其中所述ActRIIB多肽在对应于SEQ ID NO: 1的L79的位置处不包含酸性氨基酸。

6. 权利要求5的异二聚体, 其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO: 2相同的氨基酸序列。

7. 权利要求1的异二聚体, 其中所述Fc免疫球蛋白结构域包含促进异二聚体形成或抑制同二聚体形成的一种或多种氨基酸修饰。

8. 权利要求1的异二聚体, 其中所述Fc免疫球蛋白结构域是IgG免疫球蛋白。

9. 权利要求8的异二聚体, 其中所述IgG免疫球蛋白选自: IgG1、IgG2和IgG3或IgG4。

10. 权利要求8的异二聚体, 其中所述Fc免疫球蛋白包含与SEQ ID NO: 23-37中任一者相同的氨基酸序列。

11. 权利要求9或10的异二聚体, 其中所述ActRIIB-Fc融合多肽进一步包含位于ActRIIB多肽和Fc免疫球蛋白结构域之间的接头结构域, 和/或所述ALK4-Fc融合多肽进一步包含位于ALK4多肽和Fc免疫球蛋白结构域之间的接头结构域。

12. 权利要求11的异二聚体, 其中所述接头结构域选自: TGGG (SEQ ID NO: 17)、TGGGG (SEQ ID NO: 15)、SGGGG (SEQ ID NO: 16)、GGGGS (SEQ ID NO: 58)、GGG (SEQ ID NO: 13)、GGGG (SEQ ID NO: 14) 和SGGG (SEQ ID NO: 18)。

13. 权利要求11的异二聚体, 其中所述ALK4或ActRIIB多肽包含一个或多个修饰的氨基酸残基, 其选自: 糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法呢基化氨基酸、乙酰基化氨基酸、生物素化氨基酸和与脂质部分缀合的氨基酸。

14. 权利要求13的异二聚体, 其中所述异二聚体结合选自活化素A、活化素B、GDF8、GDF11和BMP6的一种或多种TGF- β 超家族配体。

15. 权利要求14的异二聚体,其中所述异二聚体不结合BMP9。

16. 药物制剂,其包含权利要求1-15中任一项的异二聚体,其中所述药物制剂包含小于10%的ALK4同多聚体和/或ActRIIB同多聚体。

17. 权利要求16的药物制剂,其中所述药物制剂包含小于5%的ALK4同多聚体和/或ActRIIB同多聚体。

18. 权利要求16的药物制剂,其中所述药物制剂包含小于1%的ALK4同多聚体和/或ActRIIB同多聚体。

19. ALK4:ActRIIB拮抗剂或ALK4:ActRIIB拮抗剂的组合在制备用于治疗具有与肌肉损失或肌肉生长不足有关的病症的患者的方法的药物中的用途,其中所述方法包括给予有需要的患者有效量的所述ALK4:ActRIIB拮抗剂或ALK4:ActRIIB拮抗剂的组合,其中所述ALK4:ActRIIB拮抗剂或ALK4:ActRIIB拮抗剂的组合包含权利要求1-15中任一项的异二聚体,其中所述患者具有肌肉萎缩或肌营养不良。

20. 权利要求19的用途,其中肌营养不良是杜氏肌营养不良。

21. 权利要求19的用途,其中肌营养不良是面肩肱型肌营养不良。

ALK4:ACTRIIB异多聚体和其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年4月6日提交的美国临时申请系列号 62/143,579和2015年9月18日提交的美国临时申请系列号62/220,836 的权益。前述申请各自的公开内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 转化生长因子- β (TGF- β) 超家族包含各种生长因子,其享有共同的序列元件和结构基序。这些蛋白已知在脊椎动物和无脊椎动物二者中对多种细胞类型发挥生物学作用。超家族的成员在胚胎发育期间在模式形成和组织特化中执行重要的功能,和可影响各种分化过程,包括脂肪生成、肌生成、软骨发生、心脏发生、血细胞生成、神经发生和上皮细胞分化。该家族分成两个概括的系统发生进化枝:更近进化的超家族成员,其包括TGF- β 、活化素和nodal,和更远相关的超家族蛋白的进化枝,其包括许多BMP和GDF [Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870]。TGF- β 家族成员具有多样的,通常互补的生物学作用。通过操纵TGF- β 家族的成员的活性,通常有可能引起生物体的显著生理学变化。例如,Piedmontese和Belgian Blue牛品种带有GDF8 (亦称为肌抑素) 基因的功能丢失突变,其导致肌肉质量显著增加[Grobet等 (1997) Nat Genet.、17 (1):71-4]。此外,在人中,GDF8的失活的等位基因与肌肉质量增加有关,并据报道,与异常优越的力量有关 [Schuelke等 (2004) N Engl J Med、350:2682-8]。

[0005] 纤维化、肌肉、骨、脂肪、红细胞和其它组织的变化可通过增强或抑制由TGF- β 家族的配体介导的细胞内信号传导 (例如,SMAD 1、2、3、5和/或8) 来实现。因此,对调节TGF- β 超家族的各种配体的活性的试剂存在需要。

[0006] 发明简述

[0007] 如本文所述的,已发现ALK4:ActRIIB异二聚体蛋白复合物是 TGF- β 超家族的配体的独特拮抗剂,与相应的ActRIIB和ALK4同二聚体比较显示不同的配体-结合特征/选择性。特别地,与任一同二聚体比较,实例性ALK4:ActRIIB异二聚体显示与活化素B的结合增强,保留如ActRIIB同二聚体所观察到的与活化素A、GDF8和GDF11的强结合,和显示与BMP9、BMP10和GDF3的结合显著减少。事实上,ALK4:ActRIIB异二聚体显示对BMP9低至无的可观察量的亲和力,尽管该配体与ActRIIB同二聚体强结合。参见图6。这些结果因此证实,与ActRIIB同二聚体相比,ALK4:ActRIIB异二聚体是TGF- β 超家族的某些配体的更具选择性的拮抗剂 (抑制剂)。因此,在其中这样的选择性拮抗作用是有利的某些应用中,ALK4:ActRIIB异二聚体比 ActRIIB同二聚体更有用。实例包括治疗应用,其中需要拮抗活化素 (例如,活化素A、活化素B、活化素AB、活化素AC)、GDF8和GDF11 的一种或多种,伴随对BMP9、BMP10和GDF3的一种或多种的拮抗作用减少。

[0008] 此外,ALK4:ActRIIB异二聚体产生显著类似于ActRIIB同二聚体的某些生物学作用,尽管两种复合物的配体选择性不同。例如,ALK4:ActRIIB异二聚体产生对骨骼肌肉和骨的有益的合成代谢作用以及对脂肪组织的分解代谢作用,非常类似于ActRIIB-Fc同二聚体。然而,不像ActRIIB同二聚体,ActRIIB:ALK4异二聚体仅显示对BMP9 和BMP10低的亲和

力或短暂结合,因此应该对由这些配体介导的过程,例如血管发生具有很少至没有同时抑制作用。这种新的选择性可用于例如,治疗需要对肌肉和骨的刺激作用和/或对脂肪的抑制作用,但不需要改变血管发生的患者。此外,ALK4:ActRIIB异二聚体在肾疾病的小鼠模型中具有各种有益作用,特别是对治疗或预防肾损伤、炎症和纤维化。因此,不希望受特定作用机制的约束,预期结合/抑制活化素(例如,活化素A、活化素B、活化素AB和活化素AC)、GDF8和/或GDF11的至少一种或多种的ALK4:ActRIIB异多聚体以及其变体是可用于促进对骨骼肌肉和骨的有益的合成代谢作用、对脂肪组织的分解代谢作用和对肾疾病的有益作用的试剂。此外,预期模拟本文所述的ALK4:ActRIIB异二聚体的结合/抑制性质的其它拮抗剂(抑制剂)或拮抗剂的组合以及直接或间接拮抗ALK4和/或ActRIIB受体的试剂、直接或间接拮抗ALK4-和/或ActRIIB-结合配体的试剂、直接或间接拮抗下游信号传导介质(例如,Smads)的试剂和/或直接或间接拮抗TGF- β 超家族共受体的试剂将具有类似的体内生物学作用,包括例如,对肌肉和骨的刺激作用和对脂肪的抑制作用。这些拮抗模拟物在本文通称为“ALK4:ActRIIB拮抗剂”或“ALK4:ActRIIB抑制剂”。

[0009] 因此,本公开内容部分地提供了异多聚体复合物(异多聚体),其包含至少一个ALK4多肽和至少一个ActRIIB多肽(ALK4:ActRIIB异多聚体)。优选地,ALK4多肽包含ALK4受体的配体-结合结构域,例如,ALK4细胞外结构域的一部分。类似地,ActRIIB多肽通常包含ActRIIB受体的配体-结合结构域,例如,ActRIIB细胞外结构域的一部分。优选地,这样的ALK4和ActRIIB多肽以及其得到的异多聚体是可溶性的。

[0010] 在某些方面,ALK4:ActRIIB异多聚体包含ALK4氨基酸序列,其与以SEQ ID NO:9的氨基酸24-34的任一个开始(例如,氨基酸24、25、26、27、28、29、30、31、32、33和34)和以SEQ ID NO:9的氨基酸101-126的任一个结束(例如,氨基酸101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125和126)的多肽具有至少70%同一性。例如,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:9的氨基酸34-101具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:9的氨基酸24-126具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:10具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列。在仍其它实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:20具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列。

[0011] 在某些方面,ALK4:ActRIIB异多聚体包含ActRIIB氨基酸序列,其与以SEQ ID NO:1的氨基酸20-29的任一个开始(例如,氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28和29)和以SEQ ID NO:1的氨基酸109-134的任一个结束(109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133和134)的多肽具有至少70%同一性。例如,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:2具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列。在仍其它实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:3 具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列。在甚至其它的实施方案中,ALK4:ActRIIB 异多聚体可包含与SEQ ID NO:5具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列。在仍甚至其它的实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的 ActRIIB氨基酸序列。在某些优选的实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体不包含在对应于SEQ ID NO:1的L79的位置处包含酸性氨基酸(例如,天然存在的氨基酸E或D或人工酸性氨基酸)的ActRIIB多肽。

[0012] 关于ALK4:ActRIIB异多聚体,还考虑了本文所述的ALK4和 ActRIIB多肽的各种组合。例如,在某些方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:9的氨基酸34-101具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在某些方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:9 的氨基酸24-126具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在其它方面,ALK4:ActRIIB 异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:10具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:2具有至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB 氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:20具有至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4 氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:2具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在

甚至其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:10具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和 b)包含与SEQ ID NO:3具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在甚至其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:20具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:3具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在仍其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:10具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:5具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在仍其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:20具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:5具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在仍甚至其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:10具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和b)包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。在仍甚至其它方面,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)包含与SEQ ID NO:20具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成的多肽;和 b)包含与SEQ ID NO:6的具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成的多肽。

[0013] 如本文所述的,ALK4:ActRIIB异多聚体结构包括例如,异二聚体、异三聚体、异四聚体、异五聚体和更高级异多聚体复合物。参见例如,图1、2和8-10。在某些优选的实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体是异二聚体。

[0014] 在某些方面,ALK4和/或ActRIIB多肽可以是融合蛋白。例如,在一些实施方案中,ALK4多肽可以是包含ALK4多肽结构域和一个或多个异源的(非-ALK4)多肽结构域的融合蛋白。类似地,在一些实施方案中,ActRIIB多肽可以是包含ActRIIB多肽结构域和一个或多个

异源的(非-ActRIIB)多肽结构域的融合蛋白。

[0015] 任选地,ALK4多肽直接连接(融合)至一个或多个异源结构域,或间插序列,例如接头可位于ALK4多肽和一个或多个异源结构域的氨基酸序列之间。类似地,ActRIIB多肽可直接连接(融合)至一个或多个异源结构域,或间插序列,例如接头可位于ActRIIB多肽和一个或多个异源结构域的氨基酸序列之间。接头可在ActRIIB或ALK4的细胞外结构域的C-末端(“尾”)处对应于大约15个氨基酸非结构化区域,或其可以是相对不含二级结构的5和15、20、30、50、100或更多个氨基酸之间的人工序列。接头可以富含甘氨酸和脯氨酸残基,和可例如包含苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列。接头的实例包括但不限于,序列TGGG (SEQ ID NO:17)、SGGG (SEQ ID NO:18)、TGGGG (SEQ ID NO:15)、SGGGG (SEQ ID NO:16)、GGGGS (SEQ ID NO:58)、GGGG (SEQ ID NO:14)和GGG (SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,一个或多个异源结构域为ALK4和/或ActRIIB融合蛋白提供需要的性质,包括例如,改进的药代动力学、更易纯化、靶向特定组织等。例如,融合蛋白的异源结构域可增强体内稳定性、体内半寿期、摄取/给药、组织定位或分布、蛋白复合物的形成、融合蛋白的多聚化和/或纯化中的一种或多种。ALK4或ActRIIB融合蛋白可包括免疫球蛋白Fc结构域(野生型或突变体)或血清白蛋白。在一些实施方案中,ALK4和/或ActRIIB多肽可包含纯化子序列,例如表位标签、FLAG 标签、多组氨酸序列和GST融合物。

[0016] 在某些实施方案中,本文所述的ALK4:ActRIIB异多聚体包含与 ActRIIB多肽共价或非共价缔合的ALK4多肽,其中ALK4多肽包含 ALK4结构域和相互作用对的第一成员(或第二成员)的氨基酸序列,和ActRIIB多肽包含ActRIIB多肽和相互作用对的第二成员(或第一成员)的氨基酸序列。本文所述的相互作用对经设计以促进二聚化或形成更高级多聚体。参见例如,图1、2和8-10。在一些实施方案中,相互作用对可以是相互作用以形成复合物、特别是异二聚体复合物的任何两个多肽序列,尽管有效的实施方案也可使用形成同二聚体序列的相互作用对。相互作用对的第一和第二成员可以是不对称的对,意思是该对的成员优先彼此缔合,而非自缔合(即,引导的相互作用对)。因此,不对称的相互作用对的第一和第二成员可缔合形成异二聚体复合物。或者,相互作用对可以是非引导的,意思是该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质的偏好,因此可具有相同或不同的氨基酸序列。因此,非引导的相互作用对的第一和第二成员可缔合形成同二聚体复合物或异二聚体复合物。任选地,相互作用对的第一成员(例如,不对称的对或非引导的相互作用对)与相互作用对的第二成员共价缔合。任选地,相互作用对的第一成员(例如,不对称的对或非引导的相互作用对)与相互作用对的第二成员非共价缔合。任选地,相互作用对(例如,不对称的对或非引导的相互作用对)的第一成员通过共价和非共价机制与相互作用对的第二成员缔合。

[0017] 在一些实施方案中,ALK4多肽是包含免疫球蛋白的Fc结构域的融合蛋白。类似地,在一些实施方案中,ActRIIB多肽是包含免疫球蛋白的Fc结构域的融合蛋白。传统的Fc融合蛋白和抗体是非引导的相互作用对的实例,尽管各种工程改造的Fc结构域已被设计为不对称的相互作用对[Spiess等(2015)Molecular Immunology 67(2A): 95-106]。因此,本文所述的相互作用对的第一成员和/或第二成员可包含免疫球蛋白的恒定结构域,包括例如,免疫球蛋白的Fc部分。例如,相互作用对的第一成员可包含源自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM免疫球蛋白的Fc结构域的氨基酸序列。这样的免疫球蛋白结构域可包含一种或多种氨基酸修饰(例如,缺失、添加和/或置换),其促进ALK4:

ActRIIB异多聚体形成。例如,相互作用对的第一成员可包含与SEQ ID NOs:23-37的任一个具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。类似地,相互作用对的第二成员可包含源自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM的Fc结构域的氨基酸序列。这样的免疫球蛋白结构域可包含一种或多种氨基酸修饰(例如,缺失、添加和/或置换),其促进ALK4:ActRIIB异多聚体形成。例如,相互作用对的第二成员可包含与SEQ ID NOs:23-37的任一个具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,相互作用对的第一成员和第二成员包含源自相同的免疫球蛋白类型和亚型的Fc结构域。在其它实施方案中,相互作用对的第一成员和第二成员包含源自不同的免疫球蛋白类型和亚型的Fc结构域。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异二聚体包含i) ALK4多肽,其包含与SEQ ID NO:44具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成,和ii) ActRIIB多肽,其包含与SEQ ID NO:41具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在其它实施方案中,ALK4:ActRIIB异二聚体包含i) ALK4多肽,其包含与SEQ ID NO:48具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成,和ii) ActRIIB多肽,其包含与SEQ ID NO:46具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。

[0018] 任选地,相互作用对的第一成员和/或第二成员(例如,不对称的对或非引导的相互作用对)包含免疫球蛋白的修饰的恒定结构域,包括例如,免疫球蛋白的修饰的Fc部分。例如,本公开内容的蛋白复合物可包含IgG的第一修饰Fc部分,其包含与选自SEQ ID NOs:23-37的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成;和IgG的第二修饰Fc部分,其可以与IgG的第一修饰的Fc部分的氨基酸序列相同或不同,包含与选自SEQ ID NOs:23-37的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含:a) 包含免疫球蛋白结构域的ALK4(或ActRIIB)融合蛋白,所述免疫球蛋白结构域包含与SEQ ID NO:23具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成,任选地其中在对应于SEQ ID NO:23的残基134和177的位置处免疫球蛋白结构域包含带正电荷的氨基酸(例如,K、R或H),和进一步任选地其中在对应于SEQ ID NO:23的残基225的位置处免疫球蛋白结构域不包含带正电荷的氨基酸(例如,K、R或H),和b) 包含免疫球蛋白结构域的ActRIIB(或ALK4)融合蛋白,所述免疫球蛋白结构域包含与SEQ ID NO:24具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上

由其组成或由其组成,任选地其中在对应于SEQ ID NO:24的残基170和187的位置处免疫球蛋白结构域包含带负电荷的(例如,D或E)氨基酸,和进一步任选地其中在对应于SEQ ID NO:24的残基225的位置处免疫球蛋白结构域包含带正电荷的氨基酸(例如,K,R或H)。在其它实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含:a)包含免疫球蛋白结构域的ALK4(或ActRIIB)融合蛋白,所述免疫球蛋白结构域包含与SEQ ID NO:27具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成,任选地其中免疫球蛋白结构域包含在对应于SEQ ID NO:27的残基132的位置处的C和在对应于SEQ ID NO:27的残基144的位置处的W,和进一步任选地其中在对应于SEQ ID NO:27的残基225的位置处免疫球蛋白结构域不包含带正电荷的氨基酸(例如,K,R或H),和b)包含免疫球蛋白结构域的ActRIIB(或ALK4)融合蛋白,所述免疫球蛋白结构域包含与SEQ ID NO:28具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成,任选地其中免疫球蛋白结构域包含在对应于SEQ ID NO:28的残基144的位置处的S、在对应于SEQ ID NO:28的残基146的位置处的A和在对应于SEQ ID NO:28的残基185的位置处的V,和进一步任选地其中在对应于SEQ ID NO:28的残基225的位置处免疫球蛋白结构域不包含带正电荷的氨基酸(例如,K,R或H)。

[0019] 在某些方面,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:39具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:41具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在某些方面,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:42具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:44具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。关于ALK4:ActRIIB异多聚体还考虑了本文所述的ALK4和ActRIIB融合多肽的各种组合。例如,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)多肽,其包含与SEQ ID NO:44具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成;和b)多肽,其包含与SEQ ID NO:41具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含a)多肽,其包含与SEQ ID NO:48具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的ALK4氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成;和b)多肽,其包含与SEQ ID NO:46具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%同一性的ActRIIB氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成。

[0020] 任选地,ALK4和/或ActRIIB多肽包含一种或多种修饰的氨基酸残基,其选自:糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法呢基化氨基酸、乙酰基化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。ALK4和/或ActRIIB多肽可包含至少一种N-连接的糖,和可包括两种、三种或更多种N-连接的糖。这样的多肽还可包含O-连接的糖。ALK4和/或ActRIIB多肽可在以适合于患者使用的方式将蛋白糖基化的各种细胞系中产生,包括工程改造的昆虫或酵母细胞,和哺乳动物细胞例如COS细胞、CHO细胞、HEK细胞和 NSO 细胞。在一些实施方案中ALK4和/或ActRIIB多肽被糖基化和具有可获自中国仓鼠卵巢细胞系的糖基化模式。优选地本公开内容的 ALK4:ActRIIB异多聚体复合物在哺乳动物(例如,小鼠或人)中显示至少4、6、12、24、36、48或72小时的血清半寿期。任选地,ALK4:ActRIIB 异多聚体在哺乳动物(例如,小鼠或人)中可显示至少6、8、10、12、14、20、25或30天的血清半寿期。

[0021] 在某些方面,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体结合一种或多种TGF- β 超家族配体。任选地,ALK4:ActRIIB异多聚体以小于或等于 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 或 10^{-12} M的 K_D 结合一种或多种这些配体。例如,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素B。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素A。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素AB。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素C。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素AC。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素BC。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素BC。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素BE。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合GDF11。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合GDF8。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合BMP6。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合GDF3。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合BMP10。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体不结合或基本上不结合BMP9。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更强的亲和力结合活化素B。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更弱的亲和力结合GDF3。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更弱的亲和力结合BMP10。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更弱的亲和力结合BMP9。

[0022] 一般而言,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体拮抗(抑制)至少一种TGF- β 超家族配体的一种或多种活性,和这样的活性改变可使用本领域已知的各种测定法测量,包括例如,基于细胞的测定法,例如本文所述的那些。在某些方面,在例如,基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可用于抑制由一种或多种TGF β 超家族配体介导的信号传导(例如,Smad 2/3和/或Smad 1/5/8信号传导)。例如,在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素A信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素B信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素AB信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素 C信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定

法中 ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素AC信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素BC信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素E信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素AE信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制活化素CE信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中 ALK4:ActRIIB异多聚体抑制GDF11信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制GDF8信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制BMP6信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中 ALK4:ActRIIB异多聚体抑制GDF3信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体抑制BMP10信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体不抑制或基本上不抑制BMP9信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体是更强的活化素B信号传导抑制剂。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB 异多聚体是更弱的GDF3信号传导抑制剂。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体是更弱的BMP10信号传导抑制剂。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB 异多聚体是更弱的BMP9信号传导抑制剂。

[0023] 本文所述的任何ALK4:ActRIIB异多聚体以及ALK4:ActRIIB拮抗剂可配制为药物制剂(组合物)。在一些实施方案中,药物制剂包含药学上可接受的载体。药物制剂优选地是无热原的(意思是无热原至管理治疗用产品质量的法规需要的程度)。药物制剂还可包括一种或多种另外的化合物,例如用于治疗本文所述的病症/病况的化合物。一般而言,ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂基本上不含ALK4和/或ActRIIB 同多聚体。例如,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂包含小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%ALK4同多聚体。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂包含小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%ActRIIB同多聚体。

[0024] 在某些方面,本公开内容提供了编码本文所述的ALK4或ActRIIB 多肽的核酸。例如,ActRIIB核酸可包含与SEQ ID NO:7的73-396 的序列或在严格性条件下与SEQ ID NO:7的核苷酸73-396的互补序列杂交的序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸,基本上由其组成或由其组成。这样的核酸可以是包含SEQ ID NOs:8或40的序列的核酸。在一些实施方案中, ActRIIB核酸包含与SEQ ID Nos:7、8和40的任一个具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列,基本上由其组成或由其组成。类似地,ALK4核酸可包含与SEQ ID NO: 11的70-378的序列或在严格性条件下与SEQ ID NO:11的核苷酸 70-378的互补序列杂交的序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸,基本上由其组成或由其组成。这样的ALK4核酸可以是包含SEQ ID NOs:12、22或43的序列的核酸。在一些实施方案中,ALK4核酸包含与SEQ ID NOs:11、12、21、22 和43的任一个具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列,基本上由其组成或由其组成。

[0025] 在某些方面,本公开内容提供了核酸序列,其包含ALK4多肽的编码序列和ActRIIB多肽的编码序列。例如,在一些实施方案中,本公开内容的核酸a) 包含与SEQ ID NOs:11、12、21、22和43的任一个具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列,基本上由其组成或由其组成,和b) 包含与SEQ ID Nos:7、8和40的任一个具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列,基本上由其组成或由其组成。优选地,ALK4和/或ActRIIB核酸是分离和/或重组核酸。本文公开的核酸可与启动子可操作连接以表达。本公开内容进一步提供了包含这样的 ALK4和/或ActRIIB多核苷酸的载体,以及包含这样的ALK4和/或 ActRIIB多核苷酸以及包含这样的ALK4和/或ActRIIB多核苷酸的载体的细胞(例如,CHO细胞),优选地自人或其它脊椎动物物种分离的细胞。

[0026] 在某些方面,ALK4多肽和/或ActRIIB多肽可在哺乳动物细胞系中表达,任选地介导ActRIIB或ALK4蛋白的合适天然糖基化以减少患者的不利免疫反应的可能性(包括兽医患者的可能性)的细胞系。已成功地使用人和CHO细胞系和预期也可使用其它常用的哺乳动物表达载体。因此本公开内容提供了包含本文公开的任何核酸的培养的细胞。这样的细胞可以是哺乳动物细胞,包括CHO细胞、NS0细胞、HEK细胞和COS细胞。其它细胞可根据预期患者的物种进行选择。其它细胞在本文公开。培养的细胞应理解为是指在实验室或其它人造条件下(例如,冷冻或在培养基中)保持和不是活生物体的一部分的细胞。

[0027] 在某些方面,本公开内容提供了制备本文所述的任何ALK4和 ActRIIB多肽以及包含这样的多肽的ALK4:ActRIIB异多聚体复合物的方法。这样的方法可包括在合适的细胞(例如,CHO细胞或COS细胞)中表达本文公开的任何核酸。例如,在一些实施方案中制备包含ALK4多肽和ActRIIB多肽的异多聚体的方法包括:a) 在适合于表达 ALK4多肽和ActRIIB多肽的条件下培养细胞,其中细胞包含ALK4 多核苷酸和ActRIIB多核苷酸;和b) 回收如此表达的异多聚体。或者,制备包含ALK4多肽和ActRIIB多肽的异多聚体的方法可包括:a) 在适合于表达ALK4多肽的条件下培养第一细胞,其中第一细胞包含ALK4多核苷酸;b) 回收如此表达的ALK4多肽;c) 在适合于表达ActRIIB多肽的条件下培养第二细胞,其中第二细胞包含ActRIIB 多核苷酸;d) 回收如此表达的ActRIIB多肽;e) 在适合于 ALK4:ActRIIB异多聚体形成的条件下合并回收的ALK4多肽和回收的ActRIIB多肽;和f) 回收ALK4:ActRIIB异多聚体。在某些实施方案中,ALK4和/或ActRIIB多肽使用TPA前导序列(例如,SEQ ID NO: 38) 表达。在某些实施方案中,ALK4和/或ActRIIB多肽在CHO细胞中表达。本文所述的ALK4和ActRIIB多肽以及它们的蛋白复合物可使用用于从细胞培养物获得蛋白的任何众所周知的技术作为粗制、部分纯化或高度纯化的级分回收。一般而言,这样的方法产生基本上不含ALK4和/或ActRIIB同多聚体的ALK4:ActRIIB异多聚体。例如,在一些实施方案中,产生ALK4:ActRIIB异多聚体的方法产生小于约 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%ALK4同多聚体。在一些实施方案中,产生ALK4:ActRIIB异多聚体的方法产生小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1% ActRIIB同多聚体。在一些实施方案中,产生ALK4:ActRIIB异多聚体的方法产生小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%ALK4同多聚体和小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%ActRIIB同多聚体。

[0028] 本公开内容进一步提供了用于治疗或预防与例如,肌肉、骨、脂肪、红细胞和其它组织相关的各种ALK4:ActRIIB-相关疾病和病况的方法和ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体)。这样的疾病和病症包括但不限于,与肌肉损失或肌肉生长不足有关的病症(例如,肌肉萎缩;肌营养不良,包括杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良和面肩肱型肌营养不良;肌萎缩侧索硬化;和恶病质)和与不需要的体重增加有关的病症(例如,肥胖、2型糖尿病或非-胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)、心血管疾病、高血压、骨关节炎、中风、呼吸问题和胆囊疾病)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,异多聚体)可用于在需要的受试者中减少体脂肪含量或减少体脂肪含量的增加速率。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,异多聚体)可用于减少患者的胆固醇和/或甘油三酯水平。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,异多聚体)可用于治疗或预防纤维化或纤维化-相关的病症或病况(例如,肾衰竭、慢性肾疾病、囊性纤维化和骨髓纤维化)。

[0029] 本公开内容进一步提供了用于治疗或预防与例如,肾有关的各种ALK4:ActRIIB-相关疾病和病况的方法和ALK4:ActRIIB拮抗剂。这样的疾病或病况包括例如,慢性肾疾病或衰竭、急性肾疾病或衰竭、具有1期肾疾病的患者、具有2期肾疾病的患者、具有3期肾疾病的患者、具有4期肾疾病的患者、具有5期肾疾病的患者、非糖尿病性肾疾病、肾小球肾炎、间质性肾炎、糖尿病性肾疾病、糖尿病性肾病、肾小球硬化症、快速进行性肾小球肾炎、肾纤维化、奥尔波特综合征、IDDM肾炎、肾小球系膜增生性肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎、新月体肾小球肾炎、肾间质性纤维化、局灶性节段性肾小球硬化症、膜性肾病、微小病变疾病、微量免疫快速进行性肾小球肾炎、IgA肾病、多囊性肾疾病、Dent病、肾胱氨酸病(nephrocytinosis)、海曼肾炎、常染色体显性(成人)多囊性肾疾病、常染色体隐性(儿童)多囊性肾疾病、急性肾损伤、肾病综合征、肾缺血、足细胞疾病或病症、蛋白尿、肾小球疾病、膜性肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球肾炎、先兆子痫、子痫、肾损伤、胶原血管病、良性体位性(姿势)蛋白尿、IgM肾病、膜性肾病、结节病、糖尿病、由于药物导致的肾损伤、法布里病、氨基酸尿症、范科尼综合征、高血压性肾硬化、间质性肾炎、镰状细胞疾病、血红蛋白尿、肌红蛋白尿、韦格纳肉芽肿病、糖原贮积病1型、慢性肾疾病、慢性肾衰竭、低肾小球滤过率(GFR)、肾血管硬化、狼疮肾炎、ANCA-阳性微量免疫新月体肾小球肾炎、慢性同种异体移植肾肾病、肾毒性、肾中毒、肾坏死、肾损伤、肾小球和管损伤、肾功能障碍、肾炎综合征、急性肾衰竭、慢性肾衰竭、近端小管功能障碍、急性肾移植排斥、慢性肾移植排斥、非-IgA肾小球系膜增生性肾小球肾炎、传染后肾小球肾炎、伴有任何类型的肾累及的血管炎、任何遗传性肾疾病、任何间质性肾炎、肾移植衰竭、肾癌、与其它病况有关的肾疾病(例如,高血压、糖尿病和自身免疫疾病)、Dent病、肾胱氨酸病(nephrocytinosis)、海曼肾炎、原发性肾疾病、坍塌性肾小球病、致密沉积物病、冷球蛋白血症相关的肾小球肾炎、Henoch-Schonlein病、传染后肾小球肾炎、细菌心内膜炎、微观多脉管炎、丘-施二氏综合征、抗-GBM-抗体介导的肾小球肾炎、淀粉样变性病、单克隆免疫球蛋白沉积病、原纤维肾小球肾炎、免疫触须样肾小球病、缺血性肾小管损伤、药物-诱导的肾小管-间质性肾炎、毒性肾小管-间质性肾炎、感染性肾小管-间质性肾炎、细菌肾盂肾炎、自多瘤病毒感染或HIV感染产生的病毒性肾小管-间质性肾炎、代谢-诱导的肾小管-间质性肾炎、混合结缔组织病、管型肾病、可自尿酸或草酸或药物-诱导的晶体沉积产生的晶体肾病、急性细胞肾小管-间质性同种异体移植排斥、自淋巴瘤或移植后淋巴增生性疾病产生的肿瘤浸润疾病、肾的阻塞性疾病、血管疾病、

血栓形成性微血管病、肾血管硬化、动脉粥样化栓塞疾病、混合结缔组织病、结节性多动脉炎、神经钙蛋白-抑制剂诱导的血管疾病、急性细胞血管同种异体移植物排斥、急性体液同种异体移植物排斥、早期肾功能减退(ERFD)、晚期肾疾病(ESRD)、肾静脉血栓症、急性肾小管坏死、肾阻塞、急性间质性肾炎、确立的慢性肾疾病、肾动脉狭窄、缺血性肾病、尿毒症、药物和毒素-诱导的慢性肾小管间质性肾炎、逆流性肾病、肾结石、古德帕斯丘综合征、正细胞性正色素性贫血、肾贫血、糖尿病性慢性肾疾病、IgG4-相关疾病、冯希-林二氏综合征、结节性硬化症、肾消耗病、髓状囊性肾疾病、肾细胞癌、腺癌、肾胚胎细胞瘤、淋巴瘤、白血病、低唾液酸化病症、慢性环孢霉素肾病、肾再灌注损伤、肾发育不良、氮质血症、双侧动脉闭塞、急性尿酸肾病、血容量不足、急性双侧梗阻性尿路病、血钙过高肾病、溶血性尿毒症综合征、急性尿潴留、恶性肾硬化、产后肾小球硬化症、硬皮病、非-古德帕斯丘抗-GBM病、微观结节性多动脉炎、过敏性肉芽肿病、急性放射性肾炎、链球菌感染后肾小球肾炎、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、镇痛剂肾病、动静脉瘘、动静脉移植、透析、异位肾、髓质海绵肾、肾性骨营养不良、孤立肾、肾积水、微白蛋白尿、尿毒症、血尿、高脂血症、低白蛋白血症、脂肪尿、酸中毒和血钾过多。在一些实施方案中,本公开内容进一步提供了用于延迟或预防从1期至2期肾疾病、2期至3期肾疾病、3期至4期肾疾病或4期至5期肾疾病的进展的方法和ALK4:ActRIIB拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容进一步提供了用于预防或减少肾炎症的方法和ALK4:ActRIIB拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容进一步提供了用于预防或减少肾损伤的方法和ALK4:ActRIIB拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容进一步提供了用于预防或减少肾纤维化的方法和ALK4:ActRIIB拮抗剂。

[0030] 附图简述

[0031] 图1A和1B显示了包含I型受体和II型受体多肽的异聚蛋白复合物的两个示意性实例。图1A描述包含一个I型受体融合多肽和一个 II型受体融合多肽的异二聚体蛋白复合物,它们可通过各多肽链内包含的多聚化结构域共价或非共价装配。两个装配的多聚化结构域构成相互作用对,其可以是引导的或非引导的。图1B描述包含图1A描述的两个异二聚体复合物的异四聚体蛋白复合物。可预期更高级的复合物。

[0032] 图2显示了包含I型受体多肽(显示为“I”) (例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ALK4蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos:9、10、19、20、42、44、47和48具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽)和II型受体多肽(显示为“II”) (例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ActRIIB蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos:1、2、3、4、5、6、39、41、45和46具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽)的异聚蛋白复合物的示意性实例。在该说明性的实施方案中,I型受体多肽是包含相互作用对的第一成员(“C₁”)的融合多肽的一部分,和II型受体多肽是包含相互作用对的第二成员(“C₂”)的融合多肽的一部分。在各融合多肽中,接头可位于I型或II型受体多肽和相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一和第二成员可以是引导的(不对称的)对,意思是该对的成员优先彼此缔合,而非自缔合,或相互作用对可以是非引导的,意思是该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质的偏好,和可具有相同的或不同的氨基酸序列。传统的Fc融合蛋白和抗体是非引导的相互作用对的实例,而各种工程改造的Fc结构域已被设计为引导的(不对称的)相互作用对[例如,Spiess等(2015)Molecular

Immunology 67 (2A):95-106]。

[0033] 图3显示人ActRIIA (SEQ ID NO:49)和人ActRIIB (SEQ ID NO:2) 的细胞外结构域的比对,其中根据多个ActRIIB和ActRIIA晶体结构的复合分析,本文推论直接接触配体的残基用框盒表示。

[0034] 图4显示不含其细胞内结构域的各种脊椎动物ActRIIB前体蛋白 (分别为SEQ ID NOs:50-55)、不含其细胞内结构域的人ActRIIA前体蛋白 (SEQ ID NO:56) 和共有序列ActRII前体蛋白 (SEQ ID NO:57) 的多个序列比对。

[0035] 图5显示使用Clustal 2.1,人IgG同种型的Fc结构域的多个序列比对。铰链区用虚下划线表示。双下划线表示在IgG1 Fc中经工程改造以促进不对称的链配对的位置和关于其它同种型IgG2、IgG3和 IgG4的相应位置的实例。

[0036] 图6显示ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体蛋白复合物与ActRIIB-Fc 同二聚体和ALK4-Fc同二聚体比较的比较性配体结合数据。对于各蛋白复合物,配体根据 k_{off} (与配体信号传导抑制良好相关的动力学常数) 排列,和以结合亲和力递减顺序列出 (最紧密结合的配体列于最上方)。在左侧,黄色、红色、绿色和蓝色线表示离解速率常数的幅度。黑色实线表示与同二聚体比较,与异二聚体的结合增强或未改变的配体,而红色虚线表示与同二聚体比较,结合显著减少。如所示的,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体显示与任一同二聚体比较,与活化素B 结合增强,保留如ActRIIB-Fc同二聚体所观察到的与活化素A、GDF8 和GDF11的强结合,和显示与BMP9、BMP10和GDF3结合显著减少。像ActRIIB-Fc同二聚体,异二聚体保留与BMP6中等-水平结合。

[0037] 图7显示源自各个脊椎动物物种的ALK4细胞外结构域的多个序列比对 (SEQ ID NOs:59-65)。

[0038] 图8A-8D显示包含ALK4多肽 (例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ALK4蛋白的细胞外结构域、例如SEQ ID Nos:9、10、19、20、42、44、47和48具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽) 和ActRIIB多肽 (例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ActRIIB蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos:1、2、3、4、5、6、39、41、45和46具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽) 的异聚蛋白复合物的示意性实例。

[0039] 在该说明性的实施方案中,ALK4多肽 (从左至右) 是包含相互作用对的第一成员 (“C₁”) 的融合多肽的一部分,和ActRIIB多肽是包含相互作用对的第二成员 (“C₂”) 的融合多肽的一部分。合适的相互作用对包括例如,重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、其截短和变体,例如本文所述的那些 [例如, Spiess等 (2015) Molecular Immunology 67 (2A):95-106]。在各融合多肽中,接头可位于ALK4或ActRIIB多肽和相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一和第二成员可以是非引导的,意味着该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质偏好,和它们可具有相同的或不同的氨基酸序列。参见图8A。或者,相互作用对可以是引导的 (不对称的) 对,意味着该对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。参见图8B。可预期更高级的复合物。参见图8C和8D。

[0040] 图9A-9G显示包含两个ALK4多肽 (例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ALK4蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos: 9、10、19、20、42、44、47和48独立地具有至

少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽)和两个ActRIIB多肽(例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ActRIIB蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos: 1、2、3、4、5、6、39、41、45和46独立地具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的两个多肽)的异聚蛋白复合物的示意性实例。

[0041] 在该说明性的实施方案9A中,第一ALK4多肽(从左至右)是包含相互作用对的第一成员("C₁") and 进一步包含另外的相互作用对的第一成员("A₁")的融合多肽的一部分;和第二ALK4多肽是包含相互作用对的第二成员("C₂") and 进一步包含相互作用对的第一成员("A₂")的融合多肽的一部分。第一ActRIIB多肽(从左至右)是包含相互作用对的第二成员("B₁")的融合多肽的一部分;和第二ActRIIB多肽是包含相互作用对的第二成员("B₂")的融合多肽的一部分。A₁和A₂可以是相同的或不同的;B₁和B₂可以是相同的或不同的,和C₁和C₂可以是相同的或不同的。在各融合多肽中,接头可位于ALK4或ActRIIB多肽和相互作用对的相应成员之间以及相互作用对之间。图9A是非引导的相互作用对的缔合的实例,意味着该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质偏好,和可具有相同的或不同的氨基酸序列。

[0042] 在该说明性的实施方案9B中,第一ActRIIB多肽(从左至右)是包含相互作用对的第一成员("C₁") and 进一步包含另外的相互作用对的第一成员("A₁")的融合多肽的一部分;和第二ActRIIB多肽是包含相互作用对的第二成员("B₂")的融合多肽的一部分。第一ALK4多肽(从左至右)是包含相互作用对的第二成员("B₁")的融合多肽的一部分;和第二ALK4多肽是包含相互作用对的第二成员("C₂") and 进一步包含相互作用对的第一成员("A₂")的融合多肽的一部分。在各融合多肽中,接头可位于ALK4或ActRIIB多肽和相互作用对的相应成员之间以及相互作用对之间。图9B是引导的(不对称的)相互作用对的缔合的实例,意味着该对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。

[0043] 合适的相互作用对包括例如,重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、其截短和变体,如本文所述的[例如,Spiess等(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。可预期更高级的复合物。参见图9C-9F。使用类似的方法(特别是使用轻链和/或重链免疫球蛋白、其截短或变体的那些),相互作用对可用于产生ALK4:ActRIIB异二聚体,其类似于抗体Fab和F(ab')₂复合物[例如,Spiess等(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。参见图9G。

[0044] 图10A和10B显示包含ALK4多肽(例如,与来自人或本文所述的其它物种的ALK4蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos:9、10、19、20、42、44、47和48具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽)、ActRIIB多肽(例如,与来自人或其它物种例如本文所述的那些的ActRIIB蛋白的细胞外结构域,例如,SEQ ID Nos:1、2、3、4、5、6、39、41、45和46具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽)和抗体的配体-结合结构域(例如,源自结合一种或多种ALK4:ActRIIB-结合配体的抗体的配体-结合结构域)的异聚蛋白复合物的示意性实例。在该说明性的实施方案中,ALK4多肽是包含相互作用对的第一成员("C₁") and 进一步包含另外的相互作用对的第一成员("A₁")的融合多肽的一部分。ActRIIB多肽是包含相互作用对的第二成员("B₁")的融合多肽的一部分。可变重链(V_H)多肽是包含相互作用对的第二成员("C₂") and 进一步包含相互作用对的第一成员("A₂")

的融合多肽的一部分。可变重链(V_L) 多肽是包含相互作用对的第二成员(B_2)的融合多肽的一部分。在各融合多肽中,接头可位于ALK4或ActRIIB多肽和相互作用对的相应成员之间、相互作用对之间和 V_H 和 V_L 多肽和相互作用对的成员之间。 A_1 和 A_2 可以是相同的或不同的; B_1 和 B_2 可以是相同的或不同的和 C_1 和 C_2 可以是相同的或不同的。合适的相互作用对包括例如,恒定重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、其截短和变体,如本文所述的[例如,Spiess等(2015)Molecular Immunology 67 (2A):95-106]。图10A 是引导的(不对称的)相互作用对的缔合的实例,意味着该对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。图10B是非引导的相互作用对的缔合的实例,意味着该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质偏好和可具有相同的或不同的氨基酸序列。

[0045] 这样的抗体-ALK4:ActRIIB复合物可用于其中需要进一步结合/拮抗不是ALK4:ActRIIB配体的试剂的情况。或者,这样的抗体 -ALK4:ActRIIB复合物可用于其中需要进一步增强ALK4:ActRIIB配体结合/拮抗作用的情况。例如,如本文的实施例证实的,活化素B、活化素A、GDF11和GDF8全都以强亲和力结合ALK4:ActRIIB异二聚体。此外,BMP6结合ALK4:ActRIIB异二聚体,但具有更弱的亲和力。在其中需要拮抗BMP6活性的某些情况下,除了一种或多种高亲和力-结合配体(例如,活化素B、活化素A、GDF11和GDF8)之外, BMP6可被排除与ALK4:ActRIIB异二聚体的结合。在这样的情况下,除了一种或多种活化素B、活化素A、GDF11和GDF8之外,添加抗体的BMP6-结合结构域至ALK4:ActRIIB异多聚体复合物会改进这样的蛋白复合物拮抗BMP6的能力。

[0046] 图11显示ALK4:ActRIIB单-陷阱(trap)多肽的示意性实例。ALK4:ActRIIB单-陷阱多肽可包含具有相同的或不同的序列的多个 ALK4结构域(例如,1、2、3、4、5、6、7、9、10或更多个结构域),和具有相同的或不同的序列的多个ActRIIB结构域(例如,1、2、3、4、5、6、7、9、10或更多个结构域)。这些ALK4和ActRIIB结构域可以任何顺序排列和在一个或多个ALK4和ActRIIB结构域之间可包含一个或多个接头结构域位置。这样的配体陷阱(ligand trap)可用作治疗或预防本文所述的疾病或病况的治疗剂。

[0047] 图12A-12D显示包含至少一个ALK4:ActRIIB单链陷阱多肽的多聚体蛋白复合物的示意性实例。在该说明性的实施方案12A和12B中,第一ALK4:ActRIIB单链陷阱多肽(从左至右)是包含相互作用对的第一成员(C_1)的融合多肽的一部分;和第二ALK4:ActRIIB单链陷阱多肽是包含相互作用对的第二成员(C_2)的融合多肽的一部分。 C_1 和 C_2 可以是相同的或不同的。第一和第二ALK4:ActRIIB单链陷阱多肽可以是相同的或不同的。在各融合多肽中,接头可位于ALK4:ActRIIB 单链陷阱多肽和相互作用对的相应成员之间。合适的相互作用对包括例如,重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、其截短和变体,如本文所述的[例如,Spiess等(2015)Molecular Immunology 67 (2A):95-106]。图12A是非引导的相互作用对的缔合的实例,意味着该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质偏好和可具有相同的或不同的氨基酸序列。图12B是引导的(不对称的)相互作用对的缔合的实例,意味着该对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。可预期更高级的复合物。此外,这样的ALK4:ActRIIB单链陷阱多肽可类似地与一种或多种ALK4多肽和/或一种或多种ActRIIB多肽共价或非共价缔合。参见图12C。此外,这样的ALK4:ActRIIB单链陷阱多肽可类似地与抗体的一种或多种配体-结合结构域(例如,结合一种或多种ALK4:ActRIIB结合配体的抗体的配体-结合结构域)共价或非共价缔合。参见图12D。

[0048] 图13显示比较性ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体 /ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体IC₅₀数据,如通过本文所述的A-204 报告基因测定法所测定的。ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体抑制活化素 A、活化素B、GDF8和GDF11信号传导途径,类似于 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体。然而,与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚体比较,BMP9和BMP10信号传导途径的ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 异二聚体抑制显著减少。这些数据证实,与相应的ActRIIB:ActRIIB同二聚体比较,ALK4:ActRIIB异二聚体是活化素A、活化素B、GDF8 和GDF11的更具选择性的拮抗剂。

[0049] 图14A-14C显示来自经过单侧输尿管梗阻 (UUO) 的小鼠肾的纤维化基因 (Colla1、纤连蛋白、PAI-1、CTGF和 α -SMA)、炎性基因 (TNF- α 和MCP1)、细胞因子基因 (TGF- β 1、GF- β 2、TGF- β 3和活化素A)、肾损伤基因 (NGAL)、缺氧-可诱导因子1- α (HIF1a) 和活化素A受体 (Acvr2A) 的基因表达谱。来自对侧的非-手术肾的样品用作对照 (Ctrl)。基因表达谱在手术后17天获得。在手术后第3、7、10和14天给予小鼠PBS或ALK4-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体。(\$)表示在仅给予PBS的小鼠中在17天时UUO肾比较在给予ALK7-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体的小鼠中在17天时UUO肾之间的统计学差异。(@)表示未检出转录物。

[0050] 发明详述

[0051] 1. 综述

[0052] 部分地,本公开内容涉及包含TGF β 超家族I型受体多肽和TGF β 超家族II型受体多肽的异多聚体、其用途和制备这样的异多聚体的方法。参见例如,图1和2。在某些优选的实施方案中,异多聚体包含 TGF β 超家族I型受体多肽的细胞外结构域和TGF β 超家族II型受体多肽的细胞外结构域。特别地,本公开内容提供了包含ALK4多肽和 ActRIIB多肽的异多聚体。优选地,这样的ALK4多肽包含ALK4受体的配体-结合结构域和这样的ActRIIB多肽包含ActRIIB受体的配体-结合结构域。在某些优选的实施方案中,与同多聚体的相应样品比较,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体 (例如,与ActRIIB:ActRIIB同二聚体或ALK4:ALK4同二聚体比较,ALK4:ActRIIB异二聚体) 具有改变的TGF β 超家族配体结合特征/特异性。

[0053] TGF- β 超家族包含超过30种分泌的因子,包括TGF- β 、活化素、nodal、骨形态发生蛋白 (BMP)、生长和分化因子 (GDF) 和抗苗勒管激素 (AMH) [Weiss等 (2013) *Developmental Biology*, 2 (1):47-63]。存在于脊椎动物和无脊椎动物二者中的该超家族的成员,在各种组织中广泛表达和在动物寿命的最早发育阶段期间发挥功能。事实上, TGF- β 超家族蛋白是干细胞自我更新、原肠胚形成、分化、器官形态发生和成年组织体内稳态的重要介质。与这种广泛的活性一致,异常的TGF- β 超家族信号传导与广泛的人病理学有关,包括例如,自身免疫疾病、心血管疾病、纤维化疾病和癌症。

[0054] TGF- β 超家族的配体共有相同的二聚体结构,其中一个单体的中心3-1/2转角螺旋紧靠另一单体的 β -链形成的凹面堆积。大部分TGF- β 家族成员通过分子间二硫键进一步稳定。该二硫键穿过由两个其它二硫键形成的环,产生所谓的“半胱氨酸结”基序 [Lin等 (2006) *Reproduction* 132:179-190和Hinck等 (2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870]。

[0055] TGF- β 超家族信号传导由I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合物介导,在配体刺激后其磷酸化和活化下游SMAD蛋白 (例如, SMAD蛋白1、2、3、5和8) [Massagué (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178]。这些I型和II型受体是跨膜蛋白,由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期的丝氨酸/苏氨酸激

酶特异性的胞质结构域构成。一般而言, I型受体介导细胞内信号传导, 而II型受体是结合TGF- β 超家族配体所需要的。在配体结合后I型和II受体形成稳定的复合物, 导致I型受体被II型受体磷酸化。

[0056] 基于它们结合的I型受体和它们活化的Smad蛋白, TGF- β 家族可分为两个系统发生分支。一个是较近进化的分支, 其包括例如, TGF- β 、活化素、GDF8、GDF9、GDF11、BMP3和nodal, 其通过活化Smads 2和3的I型受体发出信号[Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870]。另一分支包括较远相关的超家族蛋白, 和包括例如, BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF1、GDF5、GDF6和GDF7, 其通过Smads 1、5和8发出信号。

[0057] TGF- β 同种型是TGF- β 超家族的基础性成员, 其中在哺乳动物中存在3个已知同种型, 称为TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3。成熟的生物活性TGF- β 配体作为同二聚体起作用, 和主要通过I型受体ALK5发出信号, 但还已发现在内皮细胞中通过ALK1另外发出信号[Goumans 等 (2003) Mol Cell 12 (4):817-828]。TGF- β 1是最丰富和遍在表达的同种型。已知TGF- β 1在伤口愈合中具有重要的作用, 和表达组成型活性的TGF- β 1转基因的小鼠发生纤维化[Clouthier等, (1997) J Clin. Invest. 100 (11):2697-2713]。TGF- β 1还参与T细胞活化和T调节细胞的维持[Li等, (2006) Immunity 25 (3):455-471]。TGF- β 2表达首先描述于人成胶质细胞瘤细胞中, 和在胚胎神经系统的神经元和星形胶质细胞中发生。已知TGF- β 2抑制T淋巴细胞的白细胞介素-2-依赖性生长。TGF- β 3最初从人横纹肌肉瘤细胞系分离, 后来在肺腺癌和肾癌细胞系中发现。已知TGF- β 3对于腭和肺形态发生是重要的[Kubiczkova等, (2012) Journal of Translational Medicine 10:183]。

[0058] 活化素是TGF- β 超家族的成员, 并且最初作为促卵泡激素分泌的调节物发现, 但随后表征了各种生殖和非-生殖作用。有三种主要的活化素形式(A、B和AB), 其是两个紧密相关的 β 亚基的同/异二聚体(分别为 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)。人基因组还编码活化素C和活化素E, 其主要在肝脏中表达, 和包含 β_C 或 β_E 的异二聚体形式也是已知的。在TGF- β 超家族中, 活化素是独特和多功能的因子, 其可在卵巢和胎盘细胞中刺激激素产生, 支持神经元细胞存活, 根据细胞类型正面或负面影响细胞周期进展, 和至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层分化[DePaolo等(1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson等(1997) Curr Biol. 7:81-84; 和Woodruff(1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]。在数种组织中, 活化素信号传导被其相关的异二聚体抑制素拮抗。例如, 在从脑垂体的促卵泡激素(FSH)分泌的调节中, 活化素促进FSH合成和分泌, 而抑制素减少FSH合成和分泌。可调节活化素生物活性和/或结合活化素的其它蛋白包括卵泡抑素(FS)、卵泡抑素-相关蛋白(FSRP, 亦称为FLRG或FSTL3)和 α_2 -巨球蛋白。

[0059] 本文所述的结合“活化素A”的试剂是特异性结合 β_A 亚基的试剂, 无论是在分离的 β_A 亚基的情况下还是作为二聚体复合物(例如, $\beta_A\beta_A$ 同二聚体或 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)。在异二聚体复合物(例如, $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)的情况下, 结合“活化素A”的试剂对 β_A 亚基内存在的表位是特异性的, 但不结合复合物的非- β_A 亚基(例如, 复合物的 β_B 亚基)内存在的表位。类似地, 本文公开的拮抗(抑制)“活化素A”的试剂是抑制由 β_A 亚基介导的一种或多种活性的试剂, 无论是在分离的 β_A 亚基的情况下还是作为二聚体复合物(例如, $\beta_A\beta_A$ 同二聚体或 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)。在 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体的情况下, 抑制“活化素A”的试剂是特异性抑制 β_A 亚基的一种或多种活性, 但不抑制复合物的非- β_A 亚基(例如, 复合物的 β_B 亚基)的活性的试剂。该原理也适用于结合和/

或抑制“活化素B”、“活化素C”和“活化素E”的试剂。本文公开的拮抗“活化素AB”的试剂是抑制由 β_A 亚基介导的一种或多种活性和由 β_B 亚基介导的一种或多种活性的试剂。相同的原理也适用于结合和/或抑制“活化素AC”、“活化素BC”、“活化素AE”和“活化素BE”的试剂。

[0060] Nodal蛋白在中胚层和内胚层诱导和形成,以及中轴结构例如心脏和胃在早期胚胎发生中的随后组建中具有功能。已经证实,在发育的脊椎动物胚胎中背侧组织主要促进脊索和脊索前板的中轴结构,同时它募集周围的细胞形成非-中轴胚胎结构。Nodal显示通过I型和II型受体二者,和称为SMAD蛋白的细胞内效应物发出信号。研究支持 ActRIIA和ActRIIB用作Nodal的II型受体的观点[Sakuma等(2002) *Genes Cells*.2002,7:401-12]。表明Nodal配体与它们的辅因子(例如, Crypto或Cryptic)相互作用,以活化活化素I型和II型受体,其将 SMAD2磷酸化。Nodal蛋白参与对早期脊椎动物胚胎关键的许多事件,包括中胚层形成、前部图式发育和左-右轴特化。实验证据已证实nodal 信号传导活化pAR3-Lux,一种萤光素酶报告物,其之前显示对活化素和TGF- β 特异性响应。然而,nodal不能诱导pTlx2-Lux,一种对骨形态发生蛋白特异性响应的报告物。最近的结果提供了直接的生物化学证据,即Nodal信号传导由SMAD2和SMAD3介导,其也介导TGF- β 和活化素的信号传导。进一步的证据表明,细胞外蛋白Cripto或Cryptic 对于nodal信号传导是需要的,使得它与活化素或TGF- β 信号传导不同。

[0061] BMP和GDF一起形成半胱氨酸-结细胞因子的家族,其共有 TGF- β 超家族的特征性折叠[Rider等(2010) *Biochem J.*,429(1):1-12]。该家族包括例如,BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP2a、BMP3、BMP3b(亦称为GDF10)、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8、BMP8a、BMP8b、BMP9(亦称为GDF2)、BMP10、BMP11(亦称为 GDF11)、BMP12(亦称为GDF7)、BMP13(亦称为GDF6)、BMP14(亦称为GDF5)、BMP15、GDF1、GDF3(亦称为VGR2)、GDF8(亦称为肌抑素)、GDF9、GDF15和decapentaplegic。除了诱导骨形成的能力(这给予BMP其名称)之外,BMP/GDF还显示在各种组织的发育中的形态发生活性。BMP/GDF同和异二聚体与I型和II型受体二聚体的组合相互作用,以产生多种可能的信号传导复合物,导致两个竞争性的 SMAD转录因子组之一的活化。BMP/GDF具有高度特异性和局部的功能。这些以许多方式受到调节,包括BMP/GDF表达的发育限制,和通过数种特定的BMP拮抗剂蛋白的分泌,所述蛋白以高亲和力结合所述细胞因子。奇特的是,这些拮抗剂中许多类似于TGF- β 超家族配体。

[0062] 生长和分化因子-8(GDF8)亦称为肌抑素。GDF8是骨骼肌肉质量的负调节剂,和在发育和成年骨骼肌肉中高度表达。在转基因小鼠中 GDF8无效突变的特征为骨骼肌肉的显著肥大和增生[McPherron等,Nature(1997)387:83-90]。在牛中以及出人意料地在人中,在天然存在的GDF8突变中骨骼肌肉质量的类似增加是明显的[Ashmore等(1974) *Growth*,38:501-507;Swatland和Kieffer,J.Anim.Sci.(1994) 38:752-757;McPherron和Lee,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1997) 94:12457-12461;Kambadur等,Genome Res.(1997)7:910-915;和 Schuelke等(2004) *N Engl J Med*,350:2682-8]。研究已经表明,在人中与HIV-感染有关的肌肉消瘦伴随有GDF8蛋白表达的增加 [Gonzalez-Cadavid等,PNAS(1998)95:14938-43]。此外,GDF8可调节肌肉-特异性的酶(例如,肌酸激酶)的产生和调节成肌细胞细胞增殖 [国际专利申请公布号WO 00/43781]。GDF8前肽可非共价结合成熟的 GDF8结构域二聚体,灭活其生物学活性[Miyazono等(1988) *J.Biol. Chem.*,263:6407-6415;Wakefield等(1988) *J.Biol.Chem.*,263:7646-7654;和Brown等(1990) *Growth Factors*,3:35-43]。结

合GDF8 或结构相关蛋白和抑制它们的生物学活性的其它蛋白包括卵泡抑素,和可能地,卵泡抑素-相关蛋白[Gamer等(1999) Dev.Biol.,208: 222-232]。

[0063] GDF11,亦称为BMP11,是一种在小鼠发育期间在尾芽、肢芽、上颌和下颌弓和背根神经节中表达的分泌蛋白[McPherron等(1999) Nat.Genet.,22:260-264;和Nakashima等(1999) Mech.Dev.,80: 185-189]。GDF11在中胚层和神经组织二者的图式发育中起独特的作用[Gamer等(1999) Dev Biol.,208:222-32]。GDF11已表明是在鸡翼发育中软骨发生和肌生成的负调节剂[Gamer等(2001) Dev Biol., 229:407-20]。GDF11在肌肉中的表达也表明其以类似于GDF8的方式在调节肌肉生长中的作用。此外,GDF11在脑中的表达表明GDF11 还可具有与神经系统的功能有关的活性。感兴趣的是,发现GDF11 在嗅上皮中抑制神经发生[Wu等(2003) Neuron.,37:197-207]。因此, GDF11的抑制剂可具有在治疗疾病例如肌肉疾病和神经变性疾病(例如,肌萎缩侧索硬化)中的体外和体内应用。

[0064] BMP7,亦称为成骨蛋白-1(OP-1),众所周知诱导软骨和骨形成。此外,BMP7调节各种生理学过程。例如,BMP7可以是负责上皮骨发生的现象的骨诱导性因子。还发现,BMP7在钙调节和骨体内稳态中起作用。同活化素一样,BMP7结合II型受体,ActRIIA和ActRIIB。然而,BMP7和活化素募集不同的I型受体至异聚受体复合物。观察到的主要BMP7I型受体是ALK2,而活化素排他地结合ALK4 (ActRIIB)。BMP7和活化素引起不同的生物学反应和活化不同的 SMAD途径[Macias-Silva等(1998) J BiolChem.273:25628-36]。

[0065] 如本文所述的,与任一相应的ActRIIB或ALK4同二聚体比较,比较性结合数据证实ALK4:ActRIIB异二聚体具有改变的结合特征(配体选择性)。特别地,ALK4:ActRIIB异二聚体显示与任一同二聚体比较,与活化素B的结合增强,和保留如ActRIIB同二聚体所观察到的与活化素A、GDF8和GDF11的强结合。然而,ALK4:ActRIIB异二聚体显示与ActRIIB同二聚体比较,与BMP9、BMP10和GDF3的结合显著减少。特别地,对于ALK4:ActRIIB异二聚体,BMP9显示低或无观察到的亲和力,而该配体与ActRIIB同二聚体强结合。

[0066] 这些结果因此证实与ActRIIB同二聚体比较,ALK4:ActRIIB异二聚体是活化素A、活化素B、GDF8和GDF11的更具选择性的拮抗剂。因此,在其中这样的选择性拮抗作用是有利的某些应用中 ALK4:ActRIIB异二聚体比ActRIIB同二聚体更有用。实例包括治疗应用,其中需要保留活化素(例如,活化素A、活化素B、活化素AC、活化素AB)、GDF8和GDF11的一种或多种的拮抗作用,但使BMP9、BMP10和BMP6的一种或多种的拮抗作用最小化。

[0067] 此外,如本文所述的ALK4:ActRIIB异二聚体发挥对骨骼肌肉和骨的有益的合成代谢作用以及对脂肪组织的分解代谢作用,非常类似于ActRIIB同二聚体。然而,不像ActRIIB同二聚体,ActRIIB:ALK4 异二聚体仅显示对BMP9和BMP10的低-亲和力或短暂结合,因此对由这些配体介导的过程例如血管发生具有很少至没有同时抑制。这种新的选择性将用于例如,治疗需要对例如,肌肉和骨的刺激作用和对脂肪的抑制作用,但不需要血管发生改变的患者。

[0068] 在本公开内容的上下文中和在使用每个术语的特定语境中,本说明书中使用的术语通常具有其在本领域中的普通含义。下文或说明书他处论述了某些术语,以在描述本公开内容的组合物和方法以及如何制备和使用它们方面,向实施者提供另外的指导。术语的任何使用的范围或含义将根据使用其的具体上下文而显而易见。

[0069] 术语“异聚体”或“异多聚体”是至少包含第一多肽链和第二多肽链的复合物,其中

在氨基酸序列方面第二多肽链与第一多肽链差别至少一个氨基酸残基。异聚体可包含由第一和第二多肽链形成的“异二聚体”，或可形成更高级结构，其中还存在除了第一和第二多肽链之外的一个或多个多肽链。异多聚体的实例性结构包括异二聚体、异三聚体、异四聚体和其它寡聚体结构。异二聚体在本文中称为X:Y或等同地 X-Y，其中X表示第一多肽链和Y表示第二多肽链。更高级异聚体和寡聚体结构在本文中以相应的方式命名。在某些实施方案中，异多聚体是重组的（例如，一种或多种多肽组分可以是重组蛋白）、分离的和/或纯化的。

[0070] “同源的”，以其所有的语法形式和拼写变化，是指两种蛋白之间的关系，所述蛋白具有“共同的进化来源”，包括来自相同的物种的生物体的超家族的蛋白，以及来自不同物种的生物体的同源蛋白。这样的蛋白（和它们的编码核酸）具有序列同源性，如通过它们的序列相似性所反映的，无论是在同一性百分比方面，还是通过特定残基或基序和保守位置的存在。然而，在通常使用中和在本申请中，术语“同源的”当被副词例如“高度地”修饰时，可以指序列相似性，和可能或可能不涉及共同的进化来源。

[0071] 术语“序列相似性”，以其所有的语法形式，是指核酸或氨基酸序列之间同一性或一致性的程度，所述序列可能或可能不享有共同的进化来源。

[0072] 相对于参比多肽（或核苷酸）序列的“百分比（%）序列同一性”定义为在比对序列和如果需要，引入空位以实现最大百分比序列同一性，和不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分后，在候选序列中与在参比多肽（核苷酸）序列中氨基酸残基（或核酸）相同的氨基酸残基（或核酸）的百分数。为确定百分比氨基酸序列同一性的目的的比对可以在本领域的技能范围内的各种方式实现，例如，使用公开可得的计算机软件，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定合适的参数以比对序列，包括在所比较的序列的整个长度上实现最大比对所需的任何算法。为本文目的，然而，%氨基酸（核酸）序列同一性值使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 设计，和源代码已使用用户文档提交至U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, 其中它注册为U.S. Copyright Registration No. TXU510087。ALIGN-2 程序可公开获自Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., 或可从源代码编译。ALIGN-2程序应经编译在UNIX操作系统上使用，包括digital UNIX V4.0D。所有的序列比较参数通过ALIGN-2程序设定，并且不改变。

[0073] 如本文所用的，除非另外说明，“基本上不结合X”意指试剂对“X”具有大于约 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 或更大的 K_D （例如，通过用于检测 K_D 的测定法，不可检测的结合），其中“X”是指定的试剂，例如蛋白或核酸。

[0074] “激动”，以其所有语法形式，是指激活蛋白和/或基因（例如，通过激活或放大蛋白的基因表达或通过诱导失活的蛋白进入活性状态）或增加蛋白和/或基因的活性的过程。

[0075] “拮抗”，以其所有语法形式，是指抑制蛋白和/或基因（例如，通过抑制或降低蛋白的基因表达或通过诱导活性蛋白进入失活状态）或降低蛋白和/或基因的活性的过程。

[0076] 说明书和权利要求书全文中结合数值使用的术语“约”和“大约”表示准确度的区间，其为本领域技术人员熟悉和可接受的。一般而言，这样的准确度区间是 $\pm 10\%$ 。或者和特别是在生物学系统中，术语“约”和“大约”可意指在给定值的一个数量级内的值，优选地 ≤ 5 倍，和更优选地 ≤ 2 倍。

[0077] 本文公开的数值范围包括定义该范围的数字。

[0078] 术语“一个”和“一种”包括复数指代,除非使用该术语的上下文明确地另外指明。术语“一个”(或“一种”)以及术语“一种或多种”和“至少一个”在本文中可互换使用。此外,本文使用的“和/或”应视为明确公开了两个或更多个指定的特征或组分的每一个,含或不包含其它特征或组分。因此,在本文的词语例如“A和/或B”中使用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样地,在词语例如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”意图包括以下方面的每一个: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)。

[0079] 在整个说明书中,词语“包含”或变型例如“包括”或“含有”应理解为暗示包括所述的整体或整体组,但不排除任何其它整体或整体组。

[0080] 2. ALK4:ActRIIB拮抗剂

[0081] 如本文所述的,已经发现ALK4:ActRIIB异二聚体是TGF- β 超家族的配体的独特拮抗剂,与相应的ActRIIB和ALK4同二聚体比较显示不同的配体-结合特征/选择性。特别地,实例性ALK4:ActRIIB异二聚体显示与任一同二聚体比较,与活化素B的结合增强,保留如ActRIIB同二聚体所观察到的与活化素A、GDF8和GDF11的强结合,但显示与BMP9、BMP10和GDF3的结合显著减少。事实上,ALK4:ActRIIB异二聚体显示对BMP9的低至无可观察到的亲和力,而该配体强结合ActRIIB同二聚体。参见图6。这些结果因此证实,与ActRIIB同二聚体比较,ALK4:ActRIIB异二聚体是TGF- β 超家族的某些配体的更具选择性的拮抗剂(抑制剂)。因此,在其中这样的选择性拮抗作用是有利的某些应用中ALK4:ActRIIB异二聚体比ActRIIB同二聚体更有用。实例包括治疗应用,其中需要拮抗活化素(例如,活化素A、活化素B、活化素AB、活化素AC)、GDF8和GDF11的一种或多种,同时减少BMP9、BMP10和GDF3的一种或多种的拮抗作用。

[0082] 此外,ALK4:ActRIIB异二聚体产生某些生物学作用,显著类似于ActRIIB同二聚体,尽管两种复合物的配体选择性不同。例如,ALK4:ActRIIB异二聚体产生对骨骼肌肉和骨的有益的合成代谢作用以及对脂肪组织的分解代谢作用,非常类似于ActRIIB-Fc同二聚体。然而,不像ActRIIB同二聚体,ActRIIB:ALK4异二聚体仅显示对BMP9和BMP10的低亲和力或短暂结合,因此对由这些配体介导的过程例如血管发生应具有很少至没有同时抑制。这种新的选择性可用于例如,治疗需要对肌肉和骨的刺激作用和/或对脂肪的抑制作用,但不需要血管发生改变的患者。因此,尽管不希望受特定作用机制的约束,预期ALK4:ActRIIB异多聚体以及其变体,其结合/抑制至少一种或多种ALK4:ActRIIB-结合配体,将是可用于促进对骨骼肌肉和骨的有益的合成代谢作用和对脂肪组织的分解代谢作用的试剂。此外,预期其它拮抗剂(抑制剂)或拮抗剂的组合,其模拟本文所述的ALK4:ActRIIB异二聚体的以及直接或间接拮抗ALK4和/或ActRIIB受体的试剂、直接或间接拮抗ALK4-和/或ActRIIB-结合配体的试剂、直接或间接拮抗下游信号传导介质(例如,Smads)的试剂和/或直接或间接拮抗TGF- β 超家族共受体的试剂的结合/抑制性质,将具有类似的生物学作用,包括例如,对肌肉和骨的刺激作用和对脂肪的抑制作用。这些拮抗模拟物在文本中统称为“ALK4:ActRIIB拮抗剂”或“ALK4:ActRIIB抑制剂”。

[0083] A. ALK4:ActRIIB异多聚体

[0084] 在某些方面,本公开内容涉及异多聚体,其包含一种或多种ALK4受体多肽(例如,

SEQ ID NOs:9、10、19、20、42、44、47和48)和一种或多种ActRIIB受体多肽(例如,SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、39、41、45和46),其在本文通常称为“ALK4:ActRIIB异多聚体复合物”或“ALK4:ActRIIB异多聚体”。优选地,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体是可溶性的,例如,异多聚体可包含ALK4受体的可溶性部分(结构域)和ActRIIB受体的可溶性部分(结构域)。一般而言,ALK4和ActRIIB的细胞外结构域对应于这些受体的可溶性部分。因此,在一些实施方案中,本公开内容的异多聚体包含ALK4受体的细胞外结构域和ActRIIB受体的细胞外结构域。ALK4和ActRIIB受体的细胞外结构域的实例在本文公开,这样的序列以及其片段、功能变体和修饰形式可根据本公开内容的发明使用(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体组合物和其用途)。本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体包括例如,异二聚体、异三聚体、异四聚体和更高级寡聚体结构。参见例如,图1、2和8-10。在某些优选的实施方案中,本公开内容的异多聚体是ALK4:ActRIIB异二聚体。

[0085] 优选地,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体结合一种或多种TGF- β 超家族配体。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可结合活化素(例如,活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AC、活化素AB、活化素BC、活化素AE和活化素BE)、GDF8、GDF11、BMP6、GDF3和BMP10的一种或多种。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素A。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素B。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素C。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素E。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素AB。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素AC。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素AE。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素BC。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合活化素BE。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合GDF11。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合GDF8。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合BMP6。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合GDF3。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合BMP10。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体不结合或基本上不结合BMP9(例如,由于BMP9和ALK4:ActRIIB异多聚体之间相互作用的短暂性质而具有不确定的 K_a 或 K_d)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更强的亲和力结合活化素B。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更弱的亲和力结合GDF3。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更弱的亲和力结合BMP9。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体以比相应的ActRIIB同多聚体更弱的亲和力结合BMP10。任选地,ALK4:ActRIIB异多聚体可进一步结合BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP7、BMP8a、BMP8b、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF9b/BMP15、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、noda1、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty的一种或多种。

[0086] 在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体可用于抑制(拮抗)由一种或多种TGF β 超家族配体介导的信号传导(例如,Smad 2/3和/或Smad 1/5/8信号传导)。特别地,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体在例如,基于细胞的测定法中,可用于抑制通过一种或多种TGF β 超家族配体(例如本文所述的那些)的细胞内信号传导。例如,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制由活化素(例如,活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活

活化素AC、活化素AB、活化素BC、活化素AE和活化素BE)、GDF8、GDF11、BMP6、GDF3 和BMP10的一种或多种介导的信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素A信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素B信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素C信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素 D信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素E信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素AB 信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB 异多聚体可抑制活化素AC信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素BC信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素AE信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制活化素BE信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制 GDF11信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中 ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制GDF8信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制BMP6信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制GDF3信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可抑制BMP9信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体不抑制或基本上不抑制BMP9信号传导。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体是比相应的ActRIIB同多聚体更强的活化素B信号传导抑制剂。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体是比相应的ActRIIB同多聚体更弱的BMP10 信号传导抑制剂。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中 ALK4:ActRIIB异多聚体是比相应的ActRIIB同多聚体更强的GDF3 信号传导抑制剂。在一些实施方案中,在基于细胞的测定法中 ALK4:ActRIIB异多聚体是比相应的ActRIIB同多聚体更强的BMP9 信号传导抑制剂。任选地,在基于细胞的测定法中ALK4:ActRIIB异多聚体可进一步抑制通过BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP7、BMP8a、BMP8b、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF9b/BMP15、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty的一种或多种的细胞内信号传导。

[0087] 如本文所用的,术语“ActRIIB”是指来自任何物种的活化素受体II 型B(ActRIIB)蛋白家族,和通过诱变或其它修饰源自这样的ActRIIB 蛋白的变体。本文提及ActRIIB应理解为提及任何一个目前鉴定的形式。ActRIIB家族的成员通常是跨膜蛋白,由包含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期的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域构成。

[0088] 术语“ActRIIB多肽”包括包含ActRIIB家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和拟肽形式)的多肽。这样的变体ActRIIB多肽的实例在本公开内容全文以及国际专利申请公布号W0 2006/012627、W0 2008/097541和W0 2010/151426中提供,其通过引用以其整体结合到本文中。本文所述的所有ActRIIB-相关多肽的氨基酸编号基于下文提供的人ActRIIB前体蛋白序列的编号(SEQ ID NO:1),除非另外特别指出。

[0089] 人ActRIIB前体蛋白序列如下：

[0090] 1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER T**N**QSGLERCE
 [0091] 51 GEQDKRLHCY ASWR**N**SSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
 [0092] 101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
 [0093] 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
 [0094] 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
 [0095] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
 [0096] 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
 [0097] 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
 [0098] 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPL
 [0099] 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 [0100] 501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO:1)

[0101] 信号肽用单下划线表示；细胞外结构域以**粗体**表示；和潜在的内源N-连接的糖基化位点用双下划线表示。

[0102] 加工(成熟)的细胞外ActRIIB多肽序列如下：

[0103] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCC EGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO:2)

[0104] 在一些实施方案中，所述蛋白可以“SGR...”序列在N-末端而产生。细胞外结构域的C-末端“尾”通过单下划线表示。“尾”缺失的序列(Δ 15 序列)如下：

[0105] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCC EGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:3)

[0106] SEQ ID NO:1的位置64为丙氨酸(A64)的ActRIIB形式也在文献中报道。参见例如，Hilden等(1994)Blood、83(8):2163-2170。申请人已经确定，包含具有A64置换的ActRIIB细胞外结构域的ActRIIB-Fc 融合蛋白具有对活化素和GDF11相对低的亲和力。相比之下，位置 64为精氨酸(R64)的相同的ActRIIB-Fc融合蛋白具有对活化素和 GDF11的低纳摩尔至高皮摩尔范围的亲和力。因此，在本公开内容中，具有R64的序列用作人ActRIIB的“野生型”参比序列。

[0107] 位置64为丙氨酸的ActRIIB形式如下：

[0108] 1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG **RGEAETRECI**
YYNANWELER **TN**QSGLERCE

[0109] 51**GEQDKRLHCY** **ASWAN**SSGTIELVKKGCWLD
DFNCYDRQEC **VATEENPQVY**

[0110] 101 **FCCCEGNFCN** **ERFTHLPEAG** **GPEVTYEPPP** **TAPT**LLTVLA
YSLLPIGGLS

[0111] 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
 [0112] 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
 [0113] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
 [0114] 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK

- [0115] 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
- [0116] 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPGL
- [0117] 451 AQLCVTIEEC WDHDPEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
- [0118] 501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO:4)
- [0119] 信号肽通过单下划线表示和细胞外结构域通过粗体表示。
- [0120] 可选的A64形式的加工(成熟)的细胞外ActRIIB多肽序列如下:
- [0121] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCC EGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO:5)
- [0122] 在一些实施方案中,所述蛋白可以“SGR...”序列在N-末端而产生。细胞外结构域的C-末端“尾”通过单下划线表示。“尾”缺失的序列($\Delta 15$ 序列)如下:
- [0123] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD
RQECVATEENPQVYFCCC EGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:6)
- [0124] 编码人ActRIIB前体蛋白的核酸序列在下文显示(SEQ ID NO:7),代表Genbank参
比序列NM_001106.3的核苷酸25-1560,这些核苷酸编码ActRIIB前体的氨基酸1-513。所示
的序列提供了位置64的精氨酸,和可经修饰以取而代之地提供丙氨酸。信号序列用下划线
表示。
- [0125] 1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTCCTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
- [0126] 51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
- [0127] 101 CCAACCTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
- [0128] 151 GCGGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
- [0129] 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
- [0130] 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
- [0131] 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
- [0132] 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA
- [0133] 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTACTGC TGCCCATCGG GGGCTTTTCC
- [0134] 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCCTA
- [0135] 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
- [0136] 551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
- [0137] 601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTGTAGCTGTCAA
- [0138] 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
- [0139] 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
- [0140] 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
- [0141] 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
- [0142] 851 GGAACGAAC GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTCTCATAC
- [0143] 901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
- [0144] 951 TGCCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
- [0145] 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
- [0146] 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
- [0147] 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA

- [0148] 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
- [0149] 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
- [0150] 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
- [0151] 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCTG
- [0152] 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
- [0153] 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
- [0154] 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
- [0155] 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO:7)
- [0156] 编码加工的细胞外人ActRIIB多肽的核酸序列如下 (SEQ ID NO: 8)。所示的序列提供了位置64的精氨酸,和可经修饰以取而代之地提供丙氨酸。
- [0157] 1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACCTG
- [0158] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGCGAAGGCGAGC
- [0159] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC
- [0160] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
- [0161] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
- [0162] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
- [0163] 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
- [0164] (SEQ ID NO:8)
- [0165] 人ActRIIB细胞外结构域和人ActRIIA细胞外结构域的氨基酸序列比对示于图3。该比对显示两种受体内被认为直接接触ActRII配体的氨基酸残基。例如,该复合ActRII结构表示ActRIIB-配体结合口袋部分地被残基Y31、N33、N35、L38至T41、E47、E50、Q53至K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78至N83、Y85、R87、A92和E94 至F101定义。在这些位置,预期保守突变将是耐受的。
- [0166] 此外,ActRIIB在脊椎动物中是充分保守的,其中大段的细胞外结构域完全保守。例如,图4描述人ActRIIB细胞外结构域与各种 ActRIIB直向同源物比较的多-序列比对。许多结合ActRIIB的配体也是高度保守的。因此,根据这些比对,可能预测在配体-结合结构域内对正常ActRIIB-配体结合活性是重要的关键氨基酸位置以及预测可能耐受置换而不显著改变正常ActRIIB-配体结合活性的氨基酸位置。因此,根据本发明公开的方法使用的活性的人ActRIIB变体多肽可在相应位置处包括来自另一脊椎动物ActRIIB的序列的一个或多个氨基酸,或可包括类似于人或其它脊椎动物序列的残基。不意图限制,以下实例说明了这种定义活性ActRIIB变体的方法。人细胞外结构域 (SEQ ID NO:53) 中的L46在非洲蟾蜍ActRIIB (SEQ ID NO:55) 中是缬氨酸,因此该位置可被改变和任选地可被改变为另一疏水残基,例如V、I或F 或非极性残基例如A。在人细胞外结构域中的E52在非洲蟾蜍中是K,表明该位点可耐受各种变化,包括极性残基例如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y和可能A。在人细胞外结构域中的T93在非洲蟾蜍中是 K,表明在该位置处广泛的结构变异是耐受的,其中极性残基是有利的,例如S、K、R、E、D、H、G、P、G和Y。在人细胞外结构域中的F108在非洲蟾蜍中是Y,因此Y或其它疏水基团,例如I、V 或L应是耐受的。在人细胞外结构域中的E111在非洲蟾蜍中是K,表明带电荷残基在该位置处是耐受的,包括D、R、K和H,以及Q 和N。在人细胞外结构域中的R112在非洲蟾蜍中是K,表明碱性残基在该位置处是耐受的,包括R和H。人细胞外结

构域的位置119处的A相对地保守性差,在啮齿动物中作为P和在非洲蟾蜍中作为V 出现,因此基本上任何氨基酸在该位置处应该是耐受的。

[0167] 此外,在结构和功能特征方面,特别是关于配体结合,ActRII蛋白已在本领域中被表征[Attisano等(1992) *Cell* 68(1):97-108;Greenwald 等(1999) *Nature Structural Biology* 6(1):18-22;Allendorph等(2006) *PNAS* 103(20):7643-7648;Thompson等(2003) *The EMBO Journal* 22(7): 1555-1566;以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的教导之外,这些参考资料对于如何产生保留一种或多种正常活性(例如,配体-结合活性)的ActRIIB变体也提供了详细指导。

[0168] 例如,称为三指毒素折叠的结构的定义的结构基序对于通过I型和II型受体的配体结合是重要的,和通过位于各单体受体的细胞外结构域内的不同位置的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等(1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22;和Hinck(2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]。因此,由这些保守半胱氨酸的最外端所划界的人ActRIIB的核心配体-结合结构域,对应于SEQ ID NO:1 (ActRIIB前体)的位置29-109。因此,侧连这些半胱氨酸-划界的核心序列的结构更加无序的氨基酸可在N-末端截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个残基和/或在C-末端截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基,而不必然改变配体结合。对于N-末端和/或C-末端截短的实例性的ActRIIB细胞外结构域包括SEQ ID NOs:2、3、5和6。

[0169] Attisano等表明ActRIIB的细胞外结构域的C-末端的脯氨酸结的缺失减少受体对活化素的亲和力。相对于包含脯氨酸结区域和完整的近膜结构域的ActRIIB(20-134)-Fc,包含本发明的SEQ ID NO:1的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合蛋白,“ActRIIB(20-119)-Fc”,具有减少的对DF11和活化素的结合(参见例如,美国专利号7,842,663)。然而,相对于野生型,ActRIIB(20-129)-Fc蛋白保留类似的但略微减少的活性,即使脯氨酸结区域被破坏。

[0170] 因此,在氨基酸134、133、132、131、130和129处终止(相对于SEQ ID NO:1)的ActRIIB细胞外结构域全部预期是有活性的,但在134或133处终止的构建体可最具有活性。类似地,残基129-134的任一个处的突变(相对于SEQ ID NO:1)在很大程度上不预期改变配体-结合亲和力。为支持这一点,本领域已知P129和P130的突变(相对于SEQ ID NO:1)基本上不降低配体结合。因此,本公开内容的ActRIIB多肽可早在氨基酸109(最后一个半胱氨酸)终止,然而,在109和119 或其之间(例如,109、110、111、112、113、114、115、116、117、118或119)终止的形式预期具有减少的配体结合。氨基酸119(相对于本发明的SEQ ID NO:1)保守性差,因此容易改变或截短。在128(相对于SEQ ID NO:1)或更后终止的ActRIIB多肽应保留配体-结合活性。相对于SEQ ID NO:1在119和127或其之间(例如,119、120、121、122、123、124、125、126或127)终止的ActRIIB多肽将具有中等结合能力。取决于临床或实验背景,使用任何这些形式可能是理想的。

[0171] 在ActRIIB的N-末端,预期在氨基酸29或之前(相对于SEQ ID NO:1)开始的蛋白将保留配体-结合活性。氨基酸29表示最初的半胱氨酸。位置24(相对于SEQ ID NO:1)的丙氨酸至天冬酰胺突变引入 N-连接的糖基化序列,基本上不影响配体结合[美国专利号7,842,663]。这证实了信号裂解肽和半胱氨酸交联区之间的区域(对应于氨基酸 20-29)中的突变

是良好耐受的。特别地,在位置20、21、22、23和24 (相对于SEQ ID NO:1) 开始的ActRIIB多肽应保留大致的配体-结合活性,并也预期在位置25、26、27、28和29 (相对于SEQ ID NO:1) 开始的ActRIIB多肽保留配体-结合活性。已经证实,例如,美国专利号 7,842,663,令人惊讶地,在22、23、24或25开始的ActRIIB构建体将具有最大活性。

[0172] 总之,ActRIIB的活性部分(例如,配体-结合部分)的通式包含SEQ ID NO:1的氨基酸29-109。因此,ActRIIB多肽可例如,包含与开始于对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29的任何一个的残基(例如,开始于氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的任何一个) 和结束于对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109-134的任何一个的位置(例如,结束于氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134的任何一个)的ActRIIB的部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。其它实例包括开始于SEQ ID NO:1的20-29(例如,位置20、21、22、23、24、25、26、27、28 或29的任何一个)或21-29(例如,位置21、22、23、24、25、26、27、28或29的任何一个)的位置和结束于SEQ ID NO:1的119-134(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134的任何一个)、119-133(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133的任何一个)、129-134(例如,位置129、130、131、132、133或134的任何一个)或129-133(例如,位置129、130、131、132 或133的任何一个)的位置的多肽。其它实例包括开始于SEQ ID NO:1 的20-24(例如,位置20、21、22、23或24的任何一个)、21-24(例如,位置21、22、23或24的任何一个)或22-25(例如,位置22、23 或25的任何一个)的位置和结束于SEQ ID NO:1的109-134(例如,位置109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134的任何一个)、119-134(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134 的任何一个)或129-134(例如,位置129、130、131、132、133或134 的任何一个)的位置的构建体。还考虑了这些范围内的变体,特别是与 SEQ ID NO:1的相应部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的那些。

[0173] 本文所述的变化可以各种方式组合。在一些实施方案中,ActRIIB 变体包含在配体-结合口袋中不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15 个保守氨基酸变化,和在配体-结合口袋的位置40、53、55、74、79 和/或82处的0、1或多个非保守改变。结合口袋外的位点,其中变异性可特别良好耐受,包括细胞外结构域(如上所述)的氨基和羧基端和位置42-46和65-73(相对于SEQ ID NO:1)。位置65的天冬酰胺至丙氨酸的改变(N65A)实际上改进A64背景的配体结合,和因此预期对 R64背景的配体结合没有有害影响[美国专利号7,842,663]。这种改变可能消除A64背景中N65的糖基化,因此证实该区域中显著改变可能是耐受的。尽管R64A变化耐受性差,但R64K是良好耐受的,因此另一碱性残基例如H可在位置64耐受[美国专利号7,842,663]。另外,本领域描述的诱变程序的结果表明,ActRIIB中存在保守通常是有益的氨基酸位置。相对于SEQ ID NO:1,这些包括位置80(酸性或疏水氨基酸)、位置78(疏水的,特别是色氨酸)、位置37(酸性的,特别是天冬氨酸或谷氨酸)、位置56(碱性氨基酸)、位置60(疏水氨基酸,特别是苯丙氨酸或酪氨酸)。因此,本公开内容提供了在ActRIIB多肽中可能

是保守的氨基酸框架。可能期需保守的其它位置如下：位置52(酸性氨基酸)、位置55(碱性氨基酸)、位置81(酸性)、98(极性或带电荷,特别是E、D、R或K),全部相对于SEQ ID NO:1。

[0174] 在某些实施方案中,本公开内容涉及包含至少一种ActRIIB多肽的异多聚体,所述多肽包括其片段、功能变体和修饰形式。优选地,根据本公开内容的发明使用的ActRIIB多肽是可溶性的(例如, ActRIIB的细胞外结构域)。在其它优选的实施方案中,根据本公开内容使用的ActRIIB多肽结合一种或多种TGF- β 超家族配体。因此,在一些实施方案中,根据本公开内容使用的ActRIIB多肽抑制(拮抗)一种或多种TGF- β 超家族配体的活性(例如,抑制Smad信号传导)。在一些实施方案中,本公开内容的异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,其包含与开始于对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29的残基(例如,开始于氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的任何一个)和结束于对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109-134的位置(例如,结束于氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134的任何一个)的ActRIIB的部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在某些优选的实施方案中,本公开内容的异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,其包含与SEQ ID NO:1 的氨基酸29-109具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,由其组成,或基本上由其组成。在其它优选的实施方案中,本公开内容的异多聚体复合物包含至少一种 ActRIIB多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,由其组成,或基本上由其组成。在一些实施方案中,本公开内容的异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,其与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、39、41、45或46的任一个的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性。在某些优选的实施方案中,本公开内容的异多聚体不包含其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置是酸性氨基酸的ActRIIB多肽(即,不是天然存在的D或E氨基酸残基或人工酸性氨基酸)。

[0175] 在某些方面,本公开内容涉及包含ALK4多肽的蛋白复合物。如本文所用的,术语“ALK4”是指来自任何物种的活化素受体-样激酶-4 蛋白家族和通过诱变或其它修饰而源自这样的ALK4蛋白的变体。提及ALK4在文本中应理解为提及任何一种当前鉴定的形式。ALK4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期的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域构成。

[0176] 术语“ALK4多肽”包括包含ALK4家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和拟肽形式)的多肽。本文所述的所有ALK4-相关多肽的氨基酸编号基于下文人ALK4前体蛋白序列(SEQ ID NO:9)的编号,除非另外特别指出。

[0177] 标准的人ALK4前体蛋白序列(NCBI Ref Seq NP_004293)如下:

[0178] 1 MAESAGASSF FPLVLLLLAG SGG**SGPRGVQ**

ALLCACTSCL QANYTCETDG ACMVSIFNLD

[0179] 61**GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSIDL**

RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS GHLKEPEHPS

[0180] 121 **MWGPVE**LVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ

[0181] 181 DLVYDLSTSG SGSGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD VAVKIFSSRE

[0182] 241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL FDYLNRYTVT

[0183] 301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA IADLGLAVRH

[0184] 361 DAVTDTIDIA PNQRVGTKRY MAPEVLDETI NMKHFDSFKC ADIYALGLVY WEIARRCNSG

[0185] 421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG KMMRECWYAN

[0186] 481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (SEQ ID NO:9)

[0187] 信号肽由单下划线表示和细胞外结构域以粗体表示。

[0188] 加工的 (成熟的) 细胞外人ALK4多肽序列如下:

[0189] SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEH HVRTCIPKVELVPAGKPFYCLSSDL
RNTHCCYTDYCNRIDLRVPS GHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO:10)

[0190] 编码ALK4前体蛋白的核酸序列在下文显示 (SEQ ID NO:11), 对应于Genbank参比
序列NM_004302.4的核苷酸78-1592。信号序列用下划线表示和细胞外结构域以粗体表示。

[0191] ATGGCGGAGTCGGCCGAGCCTCCTCCTTCTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCCGGCAGCGCGGG

TCCGGGCCCCCGGGG

GGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGACACCAGCTGCCTCCAGG

CCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCC

ATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTG

CATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCT

ACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGC

TACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCCAG

TGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCC

CGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCTCCT GTTCCTCATCATCATCATTGTTTTCC

TTGTCATTAACATCATCA GCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCC TCATGTGAGATG

TGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCT TGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCC

TCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAG ATTATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGGAAGTAT

GGCGGGGCCGCT GGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTTCTCGTGAA GAACGGTCTTGTTTCAGG

GAAGCAGAGATATAACCAGACGGTCA TGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGATTATTGCTGCTGACAAT AAAGA

TAATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTGTTTCTGACTA TCATGAGCACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCG

GTACACAG TGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGT GGGCTGGCACACCTGCACATGG

AGATCGTGGGCACCCAAGGGA AGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCT GGTGAAGAAA

AATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTG GCTGTCCGTCATGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCC

CC GAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCCCTGAAGTA CTTGATGAAACCATTAAATATGAAACACTT

TGACTCCTTTAAATG TGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTGTATATTGGGAGATTGCTC GAAGATGCAATTCTG

GAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCC ATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCCTCCATTGAGGAAATGC GA

AAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAA CTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATG
GGGAAGATG ATGCGAGAGTGTTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGG CCCTGCGCATCAAGAAGACCCT
CTCCCAGCTCAGCGTGCAGGA AGACGTGAAGATC (SEQ ID NO:11)

[0192] 编码细胞外ALK4多肽的核酸序列如下:

[0193] TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCAC CAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGT
GTGAGACAGATGGGGCC TGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGACCATGT GCGCACCTGCATC
CCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGAAG CCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTG
CTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCC AGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTC
CATGTGGGGCC CGGTGGAG (SEQ ID NO:12)

[0194] 人ALK4前体蛋白序列的可选同种型,同种型C (NCBI Ref Seq NP_064733.3) 如下:

[0195] 1 MAESAGASSF FPLVLLLLAG SGG**SGPRGVQ**

ALLCACTSCL QANYTCETDG ACMVSIFNLD

[0196] 61 **GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSDL**

RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS GHLKEPEHPS

[0197] 121 **MWGPVE**LVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ

[0198] 181 DLVYDLSTSG SGSGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD VAVKIFSSRE

[0199] 241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK ADCSFLTLPW EVVMVSAAPK LRSLRLQYKG

[0200] 301 GRGRARFLFP LNNGTWTQLW LVSDYHEHGS LFDYLNRYTV TIEGMIKLAL SAASGLAHLH

[0201] 361 MEIVGTQGKP GIAHRDLKSK NILVKKNGMC AIADLGLAVR HDAVTDITIDI APNQRVGTRK

[0202] 421 YMAPEVLDET INMKHFDSFK CADIYALGLV YWEIARRCNS GGVHEEYQLP YYDLVPSDPS

[0203] 481 IEEMRKVVCD QKL RPNIPNW WQSYEALRVM GKMMRECWYA NGAARLTALR IKKTLSQLSV

[0204] 541 QEDVKI (SEQ ID NO:19)

[0205] 信号肽由单下划线表示和细胞外结构域以粗体表示。

[0206] 加工的(成熟的)细胞外ALK4多肽序列(同种型C)如下:

[0207] SGPRGVQ**ALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEH** HVRTCIPKVELVPAGKPFYCLSSDL
RNTHCCYTDYCNRIDLRVPS GHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO:20)

[0208] 编码ALK4前体蛋白(同种型C)的核酸序列在下文显示(SEQ ID NO:21),对应于
Genbank参比序列NM_020328.3的核苷酸78-1715。信号序列用下划线表示和细胞外结构域
以粗体表示。

[0209] ATGGCGGAGTCGGCCGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCCGGCAGCGGCGGG
TCCGGGCCCCGGGG
GGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGG

CCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCC
ATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTG
CATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCT
ACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGC
TACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCCAG
TGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCC
CGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCTCTCT GTTCCTCATCATCATCATTGTTTTCC
TTGTCATTAATATCATCA GCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCC TCATGTGAGATG
TGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCT TGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCC
TCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAG ATTATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGGAAGTAT
GGCGGGGGCCGCT GGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTTCTCGTGAA GAACGGTCTTGTTTCAGG
GAAGCAGAGATATACCAGACGGTCA TGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGATTATTGCTGCTGACAAT AAAGC
AGACTGCTCATTCTCATATTGCCATGGGAAGTTGTAAT GGTCTCTGCTGCCCCAAGCTGAGGAGCCTTAGACT
CCAATACA AGGGAGGAAGGGGAAGAGCAAGATTTTTATTCCCACTGAATAA TGGCACCTGGACACAGCTGTGGC
TTGTTTCTGACTATCATGAGC ACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATT GAGGGGATG
ATTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGG CACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGGAAGCCT
GG AATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCTGGTGAAG AAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCT
GGGCCTGGCTGTCC GTCATGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCCGAATCAG AGGGTGGGGACCAAAC
GATACATGGCCCCCTGAAGTACTTGATG AAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGAT ATT
TATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATG CAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTG
CCATATTAC GACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGT TGTATGTGATCAGAAGCTGCG
TCCCAACATCCCCAACTGGTGGC AGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGGAAGATGATGCGAGA GTGTTGGT
ATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGC ATCAAGAAGACCCTCTCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACG
TGA AGATC (SEQ ID NO:21)

[0210] 编码细胞外ALK4多肽(同种型C)的核酸序列如下:

[0211] TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGAC CAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGT
GTGAGACAGATGGGGCC TGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGT GCGCACCTGCATC
CCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAG CCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTG
CTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCC AGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTC
CATGTGGGGCC CGGTGGAG

[0212] (SEQ ID NO:22)

[0213] 在某些实施方案中,本公开内容涉及包含至少一种ALK4多肽的异多聚体,所述多肽包括其片段、功能变体和修饰形式。优选地,根据本公开内容的发明使用的ALK4多肽(例如,包含ALK4多肽的异多聚体和其用途)是可溶性的(例如,ALK4的细胞外结构域)。在其它优选的实施方案中,根据本公开内容的发明使用的ALK4多肽结合和/或抑制(拮抗)一种或多种TGF- β 超家族配体的活性(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,本公开内容的异多聚体包含至少一种ALK4多肽,其与SEQ ID NO:9、10、19、20、42、44、47或48的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、97%、98%或99%同一性。在一些实施方案中,本公开内容的异多聚体复合物由至少一种ALK4多肽组成或基本上由其组成,其与SEQ ID NO:9、10、19、20、42、44、47或48的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%或99%同一性。

[0214] ALK4在脊椎动物中是充分保守的,其中大段的细胞外结构域完全保守。例如,图7描述人ALK4细胞外结构域与各种ALK4直向同源物比较的多-序列比对。许多结合ALK4的配体也是高度保守的。因此,根据这些比对,可能预测配体-结合结构域内对正常ALK4-配体结合活性是重要的关键氨基酸位置以及预测可能耐受置换而基本上不改变正常ALK4-配体结合活性的氨基酸位置。因此,根据本发明公开的方法使用的活性人ALK4变体多肽可包括在相应位置处来自另一脊椎动物ALK4的一个或多个氨基酸,或可包括类似于人或其它脊椎动物序列的残基。不意图限制,以下实例说明了这种定义活性ALK4 变体的方法。在人ALK4细胞外结构域(SEQ ID NO:59)中的V6在小鼠(*Mus musculus*) ALK4(SEQ ID NO:63)中是异亮氨酸,因此该位置可被改变和任选地可以改变为另一疏水残基例如L、I或F或非极性残基例如A,如在原鸡(*Gallus gallus*) ALK4(SEQ ID NO:62)中所观察到的。在人细胞外结构域中的E40在原鸡ALK4中是K,表明该位点可以耐受各种变化,包括极性残基例如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y和可能的非极性残基例如A。在人细胞外结构域中S15在原鸡ALK4 中是D,表明在该位置处广泛结构变异是耐受的,其中极性残基是有利的,例如S、T、R、E、K、H、G、P、G和Y。在人细胞外结构域中的E40在原鸡ALK4中是K,表明带电荷的残基在该位置处是耐受的,包括D、R、K、H以及Q和N。在人细胞外结构域中的R80在星鼻鼹鼠(*Condylura cristata*) ALK4(SEQ ID NO:60)中是K,表明在该位置处碱性残基是耐受的,包括R、K和H。在人细胞外结构域中的Y77在野猪(*Sus scrofa*) ALK4(SEQ ID NO:64)中是F,表明芳香族残基在该位置处是耐受的,包括F、W和Y。在人细胞外结构域中的P93 是相对保守性差的,在刺猬(*Erinaceus europaeus*) ALK4(SEQ ID NO: 61)中作为S和在原鸡ALK4中作为N出现,因此基本上任何氨基酸在该位置处应该是耐受的。

[0215] 此外,在结构和功能特征方面,特别是关于配体结合,ALK4蛋白在本领域中已被表征[例如,Harison等(2003) *J Biol Chem* 278(23):21129-21135;Romano等(2012) *J Mol Model* 18(8):3617-3625;和Calvanese等(2009) 15(3):175-183]。除了本文的教导之外,这些参考资料也对于如何产生保留一种或多种正常活性(例如,配体-结合活性)的ALK4变体提供了详细指导。

[0216] 例如,称为三指毒素折叠的结构的定义的结构基序对于通过I型和II型受体的配体结合是重要的,和通过位于各单体受体的细胞外结构域内的不同位置的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等(1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22;和Hinck(2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]。因此,人ALK4 的核心配体-结合结构域,如通过这些保守半胱氨酸的最外端所划界的,对应于SEQ ID NO:9(ALK4前体)的位置34-101。因此,侧连这些半胱氨酸-划界的核心序列的结构更加无序的氨基酸可在N-末端截短1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基,或在C-末端截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个残基,而不必然改变配体结合。对于N-末端和/或C-末端截短的实例性的ALK4细胞外结构域包括SEQ ID NOs:10和20。

[0217] 因此,ALK4的活性部分(例如,配体-结合部分)的通式包含氨基酸34-101。因此

ALK4多肽可例如,包含与开始于对应于SEQ ID NO: 1的氨基酸24-34的任何一个的残基(例如,开始于氨基酸24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34的任何一个)和结束于对应于SEQ ID NO:9的氨基酸101-126的任何一个的位置(例如,结束于氨基酸101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126的任何一个)的ALK4的部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。其它实例包括开始于SEQ ID NO:9的24-34(例如,位置24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34的任何一个)、25-34(例如,位置25、26、27、28、29、30、31、32、33或34的任何一个)或26-34(例如,位置26、27、28、29、30、31、32、33或34的任何一个)的位置和结束于SEQ ID NO:9的101-126(例如,位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126的任何一个)、102-126(例如,位置102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126的任何一个)、101-125(例如,位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124或125的任何一个)、101-124(例如,位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124的任何一个)、101-121(例如,位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120或121的任何一个)、111-126(例如,位置111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126的任何一个)、111-125(例如,位置111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124或125的任何一个)、111-124(例如,位置111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124的任何一个)、121-126(例如,位置121、122、123、124、125或126的任何一个)、121-125(例如,位置121、122、123、124或125的任何一个)、121-124(例如,位置121、122、123或124的任何一个)或124-126(例如,位置124、125或126的任何一个)的位置的构建体。还考虑了这些范围内的变体,特别是与SEQ ID NO:9的相应部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的那些。

[0218] 本文所述的变化可以各种方式组合。在一些实施方案中,ALK4变体包含在配体-结合口袋中不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守氨基酸变化。结合口袋外的位点,其中变异性可特别良好地耐受,包括细胞外结构域(如上所述)的氨基和羧基端。

[0219] 在某些方面,本公开内容涉及包含一种或多种ALK4受体多肽(例如,SEQ ID Nos: 9、10、19、20、42、44、47和48)和一种或多种ActRIIB受体多肽(例如,SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、39、41、45和46)的异多聚体,其在本文通常称为“ALK4:ActRIIB异多聚体复合物”或“ALK4:ActRIIB异多聚体”。优选地,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体是可溶性的,例如,异多聚体包含ALK4受体的可溶性部分(结构域)和ActRIIB受体的可溶性部分(结构域)。一般而言,ALK4和ActRIIB的细胞外结构域对应于这些受体的可溶性部分。因此,在一些实施方案中,本公开内容的异多聚体包含ALK4受体的细胞外结构域和ActRIIB受体的细胞外结构域。ALK4和ActRIIB受体的实例性细胞外结构域在本文公开,和这样的序列以及其片段、功能变体和修饰形式可根据本公开内容的发明使用(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体组合

物和其用途)。在一些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB 异多聚体包含至少一种ALK4多肽,其包含与SEQ ID NO:9、10、19、20、42、44、47和48的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种 ALK4多肽,其包含与开始于对应于SEQ ID NO:9的氨基酸24-34、25-34或26-34的任何一个的残基和结束于101-126、102-126、101-125、101-124、101-121、111-126、111-125、111-124、121-126、121-125、121-124或124-126的位置的ALK4的部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,本公开内容的ALK4-ActRIIB异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,其包含与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、39、41、45和46的任一个的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种 ActRIIB多肽,其包含与开始于对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29、20-24、21-24、22-25或21-29的任一个的残基和结束于109-134、119-134、119-133、129-134或129-133的位置的ActRIIB的部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的序列,基本上由其组成或由其组成。在某些优选的实施方案中,本公开内容的 ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置不是酸性氨基酸(即,不是天然存在的D或E 氨基酸残基或人工酸性氨基酸)。本公开内容的ALK4:ActRIIB异多聚体包括例如,异二聚体、异三聚体、异四聚体和更高级寡聚体结构。参见例如,图1、2和8-10。在某些优选的实施方案中,本公开内容的异多聚体复合物是ALK4:ActRIIB异二聚体。

[0220] 在一些实施方案中,本公开内容考虑通过修饰ALK4多肽和/或 ActRIIB多肽的结构来制备功能变体。变体可通过氨基酸置换、缺失、添加或其组合产生。例如,合理的是预期单独置换亮氨酸为异亮氨酸或缬氨酸、天冬氨酸为谷氨酸、苏氨酸为丝氨酸或类似置换氨基酸为结构相关的氨基酸(例如,保守突变)对得到的分子的生物学活性不具有显著影响。保守置换是在其侧链上相关的氨基酸家族内发生的那些。本公开内容的多肽的氨基酸序列的变化是否产生功能同源物可通过评价变体多肽在细胞中以类似于野生型多肽的方式产生反应,或结合一种或多种TGF- β 超家族配体,包括例如BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、活化素 A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、活化素BC、活化素AE、活化素BE、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty的能力,容易地确定。

[0221] 在一些实施方案中,本公开内容考虑了为了例如增强治疗功效或稳定性等目的(例如,增加保存期限和/或抵抗蛋白水解降解),通过修饰ALK4和/或ActRIIB多肽的结构来制备功能变体。

[0222] 在一些实施方案中,本公开内容考虑了ALK4多肽和/或ActRIIB 多肽的特定突变以改变多肽的糖基化。这样的突变可经选择,以引入或消除一个或多个糖基化位点,例如O-

连接或N-连接的糖基化位点。天冬酰胺-连接的糖基化识别位点通常包含三肽序列,天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸(其中“X”是任何氨基酸),其被合适的细胞糖基化酶特异性识别。还可通过添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基至多肽的序列或通过一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基置换多肽的序列进行改变(对于O-连接的糖基化位点)。糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置的一个或两个处的各种氨基酸置换或缺失(和/或第二位置处的氨基酸缺失),导致在修饰的三肽序列处非-糖基化。增加多肽上的糖部分的数量量的另一方法是通过糖苷化学或酶偶联至多肽。根据使用的偶联模式,糖可连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离的羧基;(c)游离的巯基,例如半胱氨酸的那些;(d)游离的羟基,例如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的那些;(e)芳香族残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些;或(f)谷氨酰胺的酰胺基。除去多肽上存在的一个或多个糖部分可经化学和/或酶促实现。化学去糖基化可包括例如,将多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等效的化合物。这种处理导致大部分或所有的糖裂解,除了连接糖(N-乙酰基葡萄糖胺或N-乙酰基半乳糖胺)之外,同时保留氨基酸序列完整。多肽上糖部分的酶裂解可通过使用各种内切和外切糖苷酶实现,如Thotakura等[Meth.Enzymol.(1987) 138:350]所述。在合适时,多肽的序列可根据使用的表达系统的类型调整,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞可全都引入可受所述肽的氨基酸序列影响的不同糖基化模式。一般而言,在人中使用的本公开内容的异聚复合物可在提供合适糖基化的哺乳动物细胞系中表达,例如HEK293或CHO细胞系,尽管其它哺乳动物表达细胞系预期也可使用。

[0223] 本公开内容还考虑了产生ALK4和/或ActRIIB多肽的突变体、特别是组合突变体组,以及截短突变体的方法。组合突变体的库可特别用于鉴定功能活性的(例如,TGF- β 超家族配体结合)ALK4和/或 ActRIIB序列。筛选这样的组合文库的目的可以是产生例如,具有改变的性质、例如改变的药代动力学或改变的配体结合的多肽变体。各种筛选测定法在下文提供和这样的测定法可用于评价变体。例如,可筛选ALK4:ActRIIB复合物变体结合一种或多种TGF- β 超家族配体以阻止TGF- β 超家族配体与TGF- β 超家族受体结合和/或干扰由TGF- β 超家族配体引起的信号传导的能力。

[0224] ALK4:ActRIIB异多聚体的活性可例如,在基于细胞的测定法或体内测定法中进行测试。例如,可评价ALK4:ActRIIB异多聚体对肌肉细胞中参与肌肉产生的基因表达或蛋白活性的影响。这可按需要在存在一种或多种TGF- β 超家族配体的情况下进行,和细胞可经转染以产生ALK4:ActRIIB异多聚体和任选地,TGF- β 超家族配体。同样地,ALK4:ActRIIB异多聚体可给予小鼠或其它动物,和可使用公认的方法评价一种或多种度量,例如肌肉形成和强度。类似地,ALK4:ActRIIB 异多聚体或其变体的活性可例如,在成骨细胞、脂肪细胞和/或神经元细胞中测试对这些细胞的生长的任何影响,例如,通过本文所述的测定法和本领域众所周知的测定法。SMAD-响应报告基因可用于这样的细胞系以监测对下游信号传导的影响。

[0225] 可产生组合来源的变体,相对于参比ALK4:ActRIIB异多聚体,其具有增加的选择性或普遍增加的效力。这样的变体,当从重组DNA 构建体表达时,可用于基因治疗方案。同样地,诱变可产生变体,其具有显著不同于相应的未修饰的ALK4:ActRIIB异多聚体的细胞内半寿期。例如,改变的蛋白可被赋予对蛋白水解降解或导致未修饰多肽的破坏或以其它方式失活的其它细胞过程更稳定或更不稳定。这样的变体和编码它们的基因,可通过调节

多肽的半寿期,用于改变多肽复合物水平。例如,短的半寿期可产生更短暂的生物学作用,并且当诱导型表达系统的一部分时,可允许更紧密控制细胞内的重组多肽复合物水平。在Fc融合蛋白中,可在接头(如果有的话)和/或Fc部分中进行突变以改变ALK4:ActRIIB异多聚体的一种或多种活性,包括例如免疫原性、半寿期和溶解度。

[0226] 组合文库可通过编码多肽文库的简并基因文库产生,所述多肽各自至少包括潜在的ALK4和/或ActRIIB序列的一部分。例如,合成的寡核苷酸的混合物可经酶促连接至基因序列,使得潜在的ALK4和/或ActRIIB编码核苷酸序列的简并组可作为各个多肽表达,或者,作为较大的融合蛋白组表达(例如,对于噬菌体展示)。

[0227] 存在许多可自简并寡核苷酸序列产生潜在的同源物的文库的方法。简并基因序列的化学合成可在自动DNA合成仪中进行,和合成的基因然后可连接至合适的载体用于表达。简并寡核苷酸的合成是本领域众所周知的[Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura等(1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura等(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura等(1984) *Science* 198:1056; 和Ike等(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477]。这样的技术已经用于其它蛋白的定向进化 [Scott等, (1990) *Science* 249:386-390; Roberts等(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin等(1990) *Science* 249:404-406; Cwirla等, (1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; 以及美国专利号:5,223,409、5,198,346和 5,096,815]。

[0228] 或者,其它形式的诱变可用于产生组合文库。例如,ALK4:ActRIIB 异多聚体可通过筛选,使用例如,丙氨酸扫描诱变[Ruf等(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang等(1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint等(1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg等(1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima等(1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman等(1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 和 Cunningham等(1989) *Science* 244:1081-1085],通过接头扫描诱变 [Gustin等(1993) *Virology* 193:653-660; 和Brown等(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight等(1982) *Science* 232:316],通过饱和诱变[Meyers等, (1986) *Science* 232:613];通过PCR诱变[Leung等(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19];或通过随机诱变,包括化学诱变[Miller等(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 和Greener等(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34],从文库产生和分离。接头扫描诱变,特别是在组合的背景下,是一种用于鉴定截短(生物活性)形式的ALK4和/或ActRIIB多肽的有吸引力的方法。

[0229] 本领域已知用于筛选通过点突变和截短制备的组合文库的基因产物的各种技术,和在这方面,用于筛选cDNA文库的具有一定性质的基因产物的各种技术。这样的技术一般可适用于通过ALK4:ActRIIB 异多聚体的组合诱变产生的基因文库的快速筛选。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括克隆基因文库至可复制表达载体,用得到的载体文库转化合适的细胞,和在其中所需活性的检测促进相对容易的分离编码其产物被检测的基因的载体的条件下表达组合基因。优选的测定法包括TGF- β 超家族配体(例如, BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、活化素 A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、活化素BC、活化素AE、活化素

BE、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty)结合测定法和/或TGF- β 配体-介导细胞信号传导测定法。

[0230] 在某些实施方案中,除了在ALK4和/或ActRIIB多肽中天然存在的任何修饰之外,ALK4:ActRIIB异多聚体可进一步包含翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于,乙酰基化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰基化。结果,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含非-氨基酸元件,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖和磷酸酯。这样的非-氨基酸元件对异多聚体复合物的功能性的影响可按本文对于其它异多聚体变体所述的进行测试。当本公开内容的多肽在细胞中通过裂解新生形式的多肽产生时,翻译后加工也可能对于蛋白的正确折叠和/或功能是重要的。不同的细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有用于这样的翻译后活性的特定细胞机器和特征性机制,和可经选择以确保ALK4和/或ActRIIB多肽以及包含它们的异多聚体的正确修饰和加工。

[0231] 在某些优选的实施方案中,本文所述的异多聚体包含与至少一种ActRIIB多肽共价或非共价缔合的至少一种ALK4多肽。优选地,本文公开的多肽形成异二聚体复合物,尽管还包括更高级的异多聚体复合物,例如,但不限于,异三聚体、异四聚体和另外的寡聚体结构(参见例如,图1、2和8-10)。在一些实施方案中,ALK4和/或ActRIIB多肽包含至少一个多聚化结构域。如本文公开的,术语“多聚化结构域”是指促进至少第一多肽和至少第二多肽之间的共价或非共价相互作用的氨基酸或氨基酸序列。本文公开的多肽可共价或非共价连接至多聚化结构域。优选地,多聚化结构域促进在第一多肽(例如,ALK4多肽)和第二多肽(例如,ActRIIB多肽)之间的相互作用以促进异多聚体形成(例如,异二聚体形成),和任选地妨碍或以其它方式不利于同多聚体形成(例如,同二聚体形成),从而增加所需的异多聚体的收率(参见例如,图2)。

[0232] 本领域已知的许多方法可用于产生ALK4:ActRIIB异多聚体。例如,非天然存在的二硫键可通过替换第一多肽(例如,ALK4多肽)上的天然存在的氨基酸为游离的含硫醇残基,例如半胱氨酸构建,使得游离的硫醇与第二多肽(例如,ActRIIB多肽)上的另一游离的含硫醇残基相互作用,以致在第一和第二多肽之间形成二硫键。促进异多聚体形成的相互作用的另外的实例包括但不限于,离子相互作用,例如描述于Kjaergaard等,WO2007147901;静电导引作用,例如描述于Kannan等,U.S.8,592,562;卷曲螺旋相互作用,例如描述于Christensen等,U.S.20120302737;亮氨酸拉链,例如描述于Pack&Plueckthun,(1992)Biochemistry 31:1579-1584和螺旋-转角-螺旋基序,例如描述于Pack等,(1993)Bio/Technology 11:1271-1277。各种区段的连接可通过例如共价结合,例如通过化学交联、肽接头、二硫桥等或亲和相互作用,例如通过亲和素-生物素或亮氨酸拉链技术获得。

[0233] 在某些方面,多聚化结构域可包含相互作用对的一个组分。在一些实施方案中,本文公开的多肽可形成蛋白复合物,其包含与第二多肽共价或非共价缔合的第一多肽,其中第一多肽包含ALK4多肽的氨基酸序列和相互作用对的第一成员的氨基酸序列;和第二多肽包含ActRIIB多肽的氨基酸序列和相互作用对的第二成员的氨基酸序列。相互作用对可以是任何两个多肽序列,其相互作用以形成复合物、特别是异二聚体复合物,尽管有效的实施方案也可使用可形成同二聚体复合物的相互作用对。相互作用对的一个成员可融合至本文所述的ALK4或ActRIIB多肽,包括例如,包含与SEQ ID NOs:2、3、5、6、10和20的任何一个

的序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽序列,基本上由其组成或由其组成。相互作用对可经选择以赋予改进的性质/活性,例如增加的血清半寿期,或作为衔接子起作用,另一部分与衔接子连接以提供改进的性质/活性。例如,聚乙二醇部分可连接至相互作用对的一个或两个组分以提供改进的性质/活性,例如改进的血清半寿期。

[0234] 相互作用对的第一和第二成员可以是不对称的对,意味着该对的成员优先彼此缔合,而非自缔合。因此,不对称的相互作用对的第一和第二成员可缔合形成异二聚体复合物(参见例如,图2)。或者,相互作用对可以是非引导的,意味着该对的成员可彼此缔合或自缔合,没有实质的偏好,因此可具有相同的或不同的氨基酸序列。因此,非引导的相互作用对的第一和第二成员可缔合形成同二聚体复合物或异二聚体复合物。任选地,相互作用对(,例如,不对称的对或非引导的相互作用对)的第一成员与相互作用对的第二成员共价缔合。任选地,相互作用对(例如,不对称的对或非引导的相互作用对)的第一成员与相互作用对的第二成员非共价缔合。

[0235] 作为特定的实例,本公开内容提供了融合蛋白,其包含融合至包含免疫球蛋白的恒定结构域例如免疫球蛋白的CH1、CH2或CH3结构域或Fc结构域的多肽的ALK4或ActRIIB。本文提供了源自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc结构域。已知减少CDC或ADCC活性的其它突变,总的来说,任何这些变体包括在本公开内容内,和可用作本公开内容的异多聚体复合物的有利组分。任选地,SEQ ID NO:31的IgG1 Fc结构域在残基例如Asp-265、Lys-322和Asn-434处具有一个或多个突变(根据相应的全长IgG1编号)。在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有一个或多个这些突变(例如,Asp-265突变)的突变体Fc结构域具有减少的结合Fc γ 受体的能力。在其它情况下,相对于野生型Fc结构域,具有一个或多个这些突变(例如,Asn-434突变)的突变体Fc结构域具有增加的结合MHC I类相关Fc-受体(FcRN)的能力。

[0236] 可用于人IgG1的Fc部分(G1Fc)的天然氨基酸序列的实例在下文显示(SEQ ID NO:31)。虚下划线表示铰链区,和实下划线表示具有天然存在的变体的位置。部分地,本公开内容提供了包含与SEQ ID NO:31具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽,基本上由其组成或由其组成。根据SEQ ID NO:31使用的编号系统,G1Fc的天然存在的变体包括E134D和M136L(参见Uniprot P01857)。

[0237] 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0238] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0239] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF

[0240] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSKLTV DKSRRWQQGNV

[0241] 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:31)

[0242] 可用于人IgG2的Fc部分(G2Fc)的天然氨基酸序列的实例在下文显示(SEQ ID NO:32)。虚下划线表示铰链区和双下划线表示其中在序列(根据UniProt P01859)中存在数据库冲突的位置。部分地,本公开内容提供了包含与SEQ ID NO:32具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽,基本上由其组成或由其组成。

[0243] 1 VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ

[0244] 51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS

[0245] 101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP

[0246] 151 SDIAVEWESN GPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

[0247] 201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO:32)

[0248] 可用于人IgG3的Fc部分 (G3Fc) 的氨基酸序列的两个实例在下文显示。G3Fc的铰链区可达到其它Fc链的4倍长,和包含三个相同的15- 残基区段,前面是类似的17-残基区段。在下文显示的第一G3Fc序列 (SEQ ID NO:33) 包含由单一15-残基区段组成的短的铰链区,而第二G3Fc序列 (SEQ ID NO:34) 包含全长铰链区。在各情况下,虚下划线表示铰链区,和实下划线表示根据UniProt P01859具有天然存在的变体的位置。部分地,本公开内容提供了包含与SEQ ID NO:33和34具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽,基本上由其组成或由其组成。

[0249] 1 EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

[0250] 51 VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVS LTVLHQDWLN

[0251] 101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL

[0252] 151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS

[0253] 201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:33)

[0254] 1 ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR

CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK

[0255] 51 SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH

[0256] 101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLTV LHQDWLNGKE

[0257] 151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL

[0258] 201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ

[0259] 251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO:34)

[0260] 当转化为SEQ ID NO:33中使用的编号系统时,G3Fc (例如,参见Uniprot P01860) 的天然存在的变体包括E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y,和本公开内容提供了包含G3Fc结构域的融合蛋白,所述结构域包含一个或多个这些变化。此外,人免疫球蛋白IgG3基因 (IGHG3) 显示特征为不同的铰链长度的结构多态性[参见Uniprot P01859]。特别地,变体WIS 缺少大部分V区和所有的CH1区。除了铰链区的位置11正常存在的链间二硫键之外,在位置7处具有额外的链间二硫键。变体ZUC缺少大部分V区、所有的CH1区和部分的铰链。变体OMM可表示等位基因形式或另一γ链亚类。本公开内容提供了包含G3Fc结构域的另外的融合蛋白,所述结构域包含一种或多种这些变体。

[0261] 可用于人IgG4的Fc部分 (G4Fc) 的天然氨基酸序列的实例在下文显示 (SEQ ID NO: 35)。虚下划线表示铰链区。部分地,本公开内容提供了包含与SEQ ID NO:35具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列的多肽,基本上由其组成或由其组成。

[0262] 1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ

[0263] 51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE

[0264] 101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL

[0265] 151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ

[0266] 201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:35)

[0267] 对于G1Fc序列(SEQ ID NO:31),本文提供了Fc结构域的各种工程改造的突变,和G2Fc、G3Fc和G4Fc中的类似突变可源自在图5中它们与G1Fc的比对。由于不等的铰链长度,基于同种型比对(图5)的类似的Fc位置在SEQ ID NOs:31、32、33、34和35中具有不同的氨基酸编号。还可理解,在由铰链、C_H2和C_H3区组成的免疫球蛋白序列(例如,SEQ ID NOs:31、32、33、34和35)中给定的氨基酸位置将通过与当编号包括Uniprot数据库中整个IgG1重链恒定结构域(由C_H1、铰链、C_H2和C_H3区组成)时的相同位置不同的编号来鉴定。例如,在人G1Fc序列(SEQ ID NO:31)、人IgG1重链恒定结构域(Uniprot P01857)和人IgG1重链中选择的C_H3位置之间的对应关系如下。

不同的编号系统中的 C _H 3 位置的对应关系		
G1Fc (编号始于铰链区的第一个苏氨酸)	IgG1 重链 恒定结构域 (编号始于 C _H 1)	IgG1 重链 (Kabat 等, 1991*的 EU 编号方案)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
* Kabat 等(编辑) 1991; <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5 th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD 的 pp. 688-696		

[0269] 从单一细胞系大规模生产不对称的基于免疫球蛋白的蛋白产生的问题被称为“链缔合问题”。如在产生双特异性抗体中所主要面临的,链缔合问题涉及从当不同的重链和/或轻链在单一细胞系中产生时固有产生的多个组合中有效产生需要的多链蛋白的挑战 [Klein等(2012) mAbs 4:653-663]。当两种不同的重链和两种不同的轻链在相同的细胞中产生时,该问题是极其明显的,在该情况下存在总共16种可能的链组合(尽管这些中的一些是相同的),此时仅一种可能通常是需要的。然而,相同的原理说明了掺有仅两种不同的(不对称的)重链的所需多链融合蛋白的降低的收率。

[0270] 在单一细胞系中增加含Fc融合多肽链的所需配对以可接受的收率产生优选的不对称的融合蛋白的各种方法是本领域已知的[Klein等 (2012) mAbs 4:653-663;和Spiess等(2015) Molecular Immunology 67 (2A):95-106]。获得需要的含Fc链的配对的方法包括但不限于,基于电荷的配对(静电导引)、“结进孔(knobs-into-holes)”空间配对、SEEDbody配对和基于亮氨酸拉链的配对[Ridgway等(1996) Protein Eng 9:617-621; Merchant等(1998) Nat Biotech 16:677-681; Davis等 (2010) Protein Eng Des Sel 23: 195-202; Gunasekaran等(2010); 285:19637-19646; Wranik等(2012) J Biol Chem 287: 43331-43339; US5932448; WO 1993/011162; WO 2009/089004和WO 2011/034605]。如本文所述的,这些方法可用于产生ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异多聚体复合物,参见图8-10。

[0271] 例如,可促进特定多肽之间的相互作用的一种方法是通过改造结节进洞(protuberance-into-cavity)(结进孔(knobs-into-holes))互补区,例如描述于Arathoon等,U.S.7,183,076和Carter等,U.S.5,731,168。“结节”通过用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换来自第一多肽(例如,第一相互作用对)的界面的小的氨基酸侧链构建。与结节相同或类似大小的互补“洞”在第二多肽(例如,第二相互作用对)的界面上任选地通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链产生。在合适定位和尺寸的结节或洞存在于第一或第二多肽的界面处时,只需要在邻近界面处各自改造相应的洞或结节。

[0272] 在中性pH(7.0)时,天冬氨酸和谷氨酸带负电荷,和赖氨酸、精氨酸和组氨酸带正电荷。这些带电荷残基可用于促进异二聚体形成,同时妨碍同二聚体形成。吸引相互作用在相反电荷之间发生,和排斥相互作用在相同电荷之间发生。部分地,通过进行带电荷界面残基的定点诱变,本文公开的蛋白复合物利用吸引相互作用以促进异多聚体形成(例如,异二聚体形成),和任选地利用排斥相互作用以妨碍同二聚体形成(例如,同二聚体形成)。

[0273] 例如,IgG1 CH3结构域界面包含四个独特的带电荷残基对,其参与结构域-结构域相互作用:Asp356-Lys439'、Glu357-Lys370'、Lys392-Asp399'和Asp399-Lys409' [第二链中的残基编号通过(′)表示]。应注意,此处用于指定IgG1 CH3结构域中的残基的编号方案符合 Kabat的EU编号方案。由于CH3-CH3结构域相互作用中存在的2-倍对称,每个独特的相互作用在结构中将出现两次(例如,Asp-399-Lys409'和Lys409-Asp399')。在野生型序列中,K409-D399'有利于异二聚体和同二聚体二者形成。第一链中改变电荷极性的单一突变(例如,K409E;正电荷至负电荷)导致对形成第一链同二聚体不利的相互作用。该不利的相互作用由于在相同电荷之间发生的排斥相互作用(负-负;K409E-D399'和D399-K409E')而产生。第二链中改变电荷极性的类似的突变(D399K';负电荷至正电荷)导致对于第二链同二聚体形成不利的相互作用(K409'-D399K'和D399K-K409')。但同时,这两个突变(K409E和D399K')导致对于异二聚体形成有利的相互作用(K409E-D399K'和D399-K409')。

[0274] 对异二聚体形成和同二聚体阻碍的静电导引作用可进一步通过另外的带电荷残基的突变来增强,所述残基可以与或不与第二链中的相反电荷残基,包括例如,Arg355和Lys360配对。下表列出了可使用的可能的电荷改变突变(单独或组合),以增强ALK4:ActRIIB 异多聚体形成。

增强异二聚体形成的配对带电荷残基突变的实例			
第一链中的位置	第一链中的突变	第二链中的相互作用位置	第二链中相应的突变
[0275] Lys409	Asp 或 Glu	Asp399'	Lys、Arg 或 His
Lys392	Asp 或 Glu	Asp399'	Lys、Arg 或 His
Lys439	Asp 或 Glu	Asp356'	Lys、Arg 或 His
Lys370	Asp 或 Glu	Glu357'	Lys、Arg 或 His
[0276] Asp399	Lys、Arg 或 His	Lys409'	Asp 或 Glu
Asp399	Lys、Arg 或 His	Lys392'	Asp 或 Glu
Asp356	Lys、Arg 或 His	Lys439'	Asp 或 Glu
Glu357	Lys、Arg 或 His	Lys370'	Asp 或 Glu

[0277] 在一些实施方案中,构成本申请的融合蛋白中的CH3-CH3界面的一个或多个残基被带电荷氨基酸替换,使得相互作用成为静电不利的。例如,界面中的带正电荷的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸或组氨酸)被带负电荷的氨基酸(例如,天冬氨酸或谷氨酸)替换。或者,或与前述置换组合,界面中的带负电荷的氨基酸被带正电荷的氨基酸替换。在某些实施方案中,氨基酸被具有所需的电荷性质的非天然存在的氨基酸替换。应注意,将带负电荷残基(Asp或Glu)突变为His导致侧链体积增加,这可引起空间问题。此外,His质子供体-和受体-形式取决于局部环境。设计策略应考虑这些问题。因为界面残基在人和小鼠IgG 亚类中高度保守,本文公开的静电导引作用可适用于人和小鼠IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。该策略还可扩展至改变CH3结构域界面处的不带电荷的残基为带电荷的残基。

[0278] 部分地,本公开内容提供了使用经工程改造以根据电荷配对(静电导引)互补的Fc序列,不对称的含Fc多肽链的所需配对。具有静电互补性的一对Fc序列之一可任意地融合至构建体的ALK4或ActRIIB 多肽,含或不含任选的接头,以产生ALK4:ActRIIB异多聚体。该单一链可在选择的细胞中同与第一Fc互补的Fc序列一起共表达,以帮助产生所需的多链构建体(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体)。在基于静电导引的该实例中,SEQ ID NO:23[人G1Fc(E134K/D177K)]和SEQ ID NO:24[人G1Fc(K170D/K187D)]是互补Fc序列的实例,其中工程改造的氨基酸置换用双下划线表示,和构建体的TGF- β 超家族I型或 II型受体多肽可融合至SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24,但不是二者。鉴于在天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc和天然hG4Fc之间高程度的氨基酸序列同一性,可以理解,在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc 的相应位置处的氨基酸置换(参见图5)将产生互补Fc对,其可用于代替下文的互补hG1Fc对(SEQ ID NOs:23和24)。

[0279] 1 THTCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0280] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0281] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRKEMTKNQ VSLTCLVKGF

[0282] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVVLKSDG SFFLYSKLTV DKSRRWQQGNV

[0283] 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:23)
[0284] 1 THTCPAPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
[0285] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
[0286] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLTCLVKGF
[0287] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNY D TTPVLDSDG SFFLYS D LTV DKSRWQQGNV

[0288] 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:24)

[0289] 部分地,本公开内容提供了使用对于空间互补性经工程改造的Fc 序列,不对称的含Fc多肽链的所需配对。部分地,本公开内容提供了结进孔配对作为空间互补性的实例。具有空间互补性的一对Fc序列之一可任意地融合至构建体的ALK4或ActRIIB多肽,含或不含任选的接头,以产生ALK4:ActRIIB异多聚体。该单一链可在选择的细胞中同与第一Fc互补的Fc序列一起共-表达,以帮助产生所需的多链构建体。在基于结进孔配对的该实例中,SEQ ID NO:25[人 G1Fc (T144Y)]和SEQ ID NO:26[人G1Fc (Y185T)]是互补Fc序列的实例,其中工程改造的氨基酸置换用双下划线表示,和构建体的ALK4 或ActRIIB多肽可融合至SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26,但不是二者。鉴于在天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc和天然hG4Fc之间高程度的氨基酸序列同一性,可以理解,在hG2Fc、hG3Fc或 hG4Fc的相应位置处的氨基酸置换(参见图5)将产生互补Fc对,其可用于代替下文的互补hG1Fc对 (SEQ ID NOs:25和26)。

[0290] 1 THTCPAPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
[0291] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
[0292] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL P SREEMTKNQ VSL Y CLVKGF
[0293] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
[0294] 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:25)
[0295] 1 THTCPAPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
[0296] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
[0297] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL P SREEMTKNQ VSLTCLVKGF
[0298] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFL T SKLTV DKSRWQQGNV
[0299] 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:26)

[0300] 基于结进孔配对结合工程改造的二硫键的Fc互补性的实例公开于 SEQ ID NO:27 [hG1Fc (S132C/T144W)]和SEQ ID NO:28 [hG1Fc (Y127C/T144S/L146A/Y185V)]。这些序列中的工程改造的氨基酸置换用双下划线表示,和构建体的TGF- β 超家族I型或II型多肽可融合至 SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28,但不是二者。鉴于在天然hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc和天然hG4Fc之间高程度的氨基酸序列同一性,可以理解,在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc的相应位置处的氨基酸置换(参见图5)将产生互补Fc对,其可用于代替下文的互补hG1Fc对 (SEQ ID NOs:27和28)。

[0301] 1 THTCPAPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
[0302] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
[0303] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P C REEMTKNQ VSL W CLVKGF
[0304] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

[0305] 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:27)

[0306] 1 THTCPPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0307] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0308] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF

[0309] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV

[0310] 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:28)

[0311] 部分地,使用经工程改造以产生人IgG和IgA C_H3结构域的互相交叉β-链区段的Fc序列,本公开内容提供了所需的不对称的含Fc多肽链的配对。这样的方法包括使用链交换工程改造结构域(SEED) C_H3异二聚体,其允许形成SEEDbody融合蛋白[Davis等(2010) Protein Eng Design Sel 23:195-202]。具有SEEDbody互补性的一对Fc序列之一可任意地融合至构建体的ALK4或ActRIIB,含或不含任选的接头,以产生ALK4或ActRIIB 融合多肽。该单一链可在选择的细胞中同与第一Fc互补的Fc序列一起共表达以有利于所需多链构建体的产生。在基于SEEDbody (Sb) 配对的该实例中,SEQ ID NO:29[hG1Fc (Sb_{AG})]和SEQ ID NO:30[hG1Fc (Sb_{GA})]是互补IgG Fc序列的实例,其中来自IgA Fc的工程改造的氨基酸置换用双下划线表示,和构建体的ALK4或ActRIIB多肽可融合至SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30,但不是二者。鉴于在天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc和天然hG4Fc之间高程度的氨基酸序列同一性,可以理解,在hG1Fc、hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc的相应位置处的氨基酸置换(见图5)将产生Fc单体,其可用于下文的互补IgG-IgA对(SEQ ID NOs:29和30)。

[0312] 1 THTCPPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0313] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0314] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PFRPEVHLLP PSREEMTKNQ VSLTCLARGF

[0315] 151 YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTFSRQEPSQ GTTTFAVTSK LTVDKSRWQQ

[0316] 201 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK (SEQ ID NO:29)

[0317] 1 THTCPPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0318] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0319] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSEELALNE LvTLTCLVKG

[0320] 151 FYPSDIAVEWESNGQELPRE KYLTWAPVLD SDGSFFLYSILRVAAEDwKK

[0321] 201 GDTFSCSVMH EALHNHYTQK SLDRSPGK (SEQ ID NO:30)

[0322] 部分地,本公开内容提供了所需的不对称的含Fc多肽链的配对,其中可裂解的亮氨酸拉链结构域连接至Fc C_H3结构域的C-末端。亮氨酸拉链的连接足以引起异二聚体抗体重链的优先装配[Wranik等(2012) J Biol Chem 287:43331-43339]。如本文公开的,连接至亮氨酸拉链-形成链的一对Fc序列之一可任意地融合至构建体的ALK4或 ActRIIB多肽,含或不含任选的接头,以产生ALK4或ActRIIB融合多肽。该单一链可在选择的细胞中同连接至互补亮氨酸拉链-形成链的 Fc序列一起共表达,以利于所需多链构建体的产生。纯化后构建体用细菌内切蛋白酶Lys-C进行蛋白水解消化可释放亮氨酸拉链结构域,产生Fc构建体,其结构与天然Fc相同。在基于亮氨酸拉链配对的该实例中,SEQ ID NO:36[hG1Fc-Ap1(酸性)]和SEQ ID NO:37 [hG1Fc-Bp1(碱性)]是互补IgG Fc序列的实例,其中工程改造的互补

亮氨酸拉链序列用下划线表示,和构建体的ALK4或ActRIIB多肽可融合至SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37,但不是二者。鉴于在天然 hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc和天然hG4Fc之间高度的氨基酸序列同一性,可以理解,连接至hG1Fc、hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc的亮氨酸拉链-形成序列(含或不含任选的接头)(见图5)将产生Fc单体,其可用于下文的互补亮氨酸拉链-形成对(SEQ ID NOs:36和37)。

[0323] 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0324] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0325] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF

[0326] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

[0327] 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGSQAQLEKELOALEK ENAQLEWELQ

[0328] 251 ALEKELAQGAT (SEQ ID NO:36)

[0329] 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0330] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

[0331] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF

[0332] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

[0333] 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGSQAQKKKLQALKK KNAQLKWKLQ

[0334] 251 ALKKKLAQGA T (SEQ ID NO:37)

[0335] 如上文所述的,在单一细胞系中增加含Fc融合多肽链的所需配对以可接受的收率产生优选的不对称的融合蛋白的各种方法是本领域已知的[Klein等(2012)mAbs 4:653-663;和Spiess等(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。此外,ALK4:ActRIIB异多聚体可使用包含ALK4或ActRIIB多肽的重链和轻链融合蛋白的组合产生。例如,在一些实施方案中,ALK4多肽可融合(含或不含接头结构域)至免疫球蛋白重链(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1或IgA2),其包含至少一部分C_H1结构域。类似地,ActRIIB多肽可融合(含或不含接头结构域)至免疫球蛋白轻链(κ 或 λ),其包含至少一部分轻链恒定结构域(C_L)。在可选的实施方案中,ActRIIB多肽可融合(含或不含接头结构域)至免疫球蛋白重链(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1或IgA2),其包含至少一部分C_H1结构域,和ALK4多肽可融合(含或不含接头结构域)至免疫球蛋白轻链(κ 或 λ),其包含至少一部分轻链恒定结构域(C_L)。该设计利用重链与轻链异二聚化的天然能力。特别是,重链和轻链的异二聚化在C_H1与C_L之间发生,其通常通过经过二硫桥共价连接两个结构域来稳定。使用全长重链或包含铰链区的至少一部分重链的构建体可产生抗体-样分子,其包含两个“轻链”和两个“重链”。参见图9。该设计的潜在益处是其可更紧密模拟天然存在的ALK4-配体-ActRIIB复合物和可显示比相当的单异二聚体更高的配体亲和力。在一些实施方案中,该设计可通过掺入各种重链截短进行修改,包括例如,包含C_H1结构域和一些或全部铰链结构域的截短(产生F(ab')₂-样分子)以及仅包含C_H1结构域或其片段的截短(产生Fab-样分子)。参见图9G。用于设计这样的异多聚体构建体的各种方法描述于US 2009/0010879、Klein等[(2012)mAbs 4:653-663]和Spiess等[(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106],其内容以其整体并入本文。

[0336] 在一些实施方案中,需要产生抗体-样ALK4:ActRIIB异二聚体,其包含至少一个分支的复合物,其包含ALK4-C_L:ActRIIB-C_H1异二聚体对;和至少第二分支,其包含ActRIIB-C_L:ALK4-C_H1异二聚体对。参见例如,图9B。这样的异二聚体复合物可例如,使用重链和轻链

不对称配对技术的组合产生[Spiess等(2015)Molecular Immunology 67 (2A):95-106]。例如,在CrossMab技术[Schaefer等(2011).Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.108:11187-11192]中,轻链错配使用结构域交叉(crossover)和使用结进孔异二聚化的重链克服[Merchant等(1998)Nat. Biotechnol.16:677-681]。对于结构域交叉,可变结构域或恒定结构域在轻链和重链之间交换以产生两个不对称的Fab臂,其驱动同源轻链配对,同时保留可变结构域的结构和功能完整性[Fenn等(2013)PLoS ONE 8:e61953]。用于克服轻链错配的可选的方法是设计具有正交Fab界面的重链和轻链[Lewis(2014)Nat.Biotechnol.32:191-198]。这已通过计算建模[Das等(2008)Annu.Rev.Biochem.77:363-382]与X-射线晶体学的组合实现,以鉴定 V_H/V_L 和 C_H1/C_L 界面的突变。对于使用该方法产生的异二聚体,可能需要工程改造突变至 V_H/V_L 和 C_H1/C_L 界面二者以最小化重链/轻链错配。设计的正交Fab界面可结合重链异二聚化策略使用,以促进在单一宿主细胞中有效的IgG产生。静电导引也可用于产生正交Fab界面以促进这样的异二聚体的构建。肽接头可用于确保轻链和重链以称为“LUZ-Y”的形式同源配对[Wranik等(2012)J. Biol.Chem.287:43331-43339],其中重链异二聚化使用亮氨酸拉链实现,其可随后通过蛋白质水解体外除去。

[0337] 或者,ALK4:ActRIIB异多聚体可包含本文所述的一种或多种单链配体陷阱,任选地其可与一种或多种ALK4或ActRIIB多肽以及另外的ALK4:ActRIIB单链配体陷阱共价或非共价缔合[US 2011/0236309和US2009/0010879]。参见图12。如本文所述的,单链配体陷阱不需要与任何多聚化结构域例如卷曲螺旋Fc结构域融合而为多价的。一般而言,本公开内容的单链配体陷阱至少包含一个ALK4多肽结构域和一个ActRIIB多肽结构域。ALK4和ActRIIB多肽结构域,在本文通常称为结合结构域(BD),任选地可通过接头区连接。

[0338] 例如,在一个方面,本公开内容提供了异多聚体,其包含具有以下结构的多肽:

[0339] $(\langle BD1 \rangle - \text{接头}1)_k - [\langle BD2 \rangle - \text{接头}2 - \{\langle BD3 \rangle - \text{接头}3\}_f]_n - (\langle BD4 \rangle)_m - (\text{接头}4 - BD5)_{d_h}$

[0340] 其中:n和h独立地大于或等于1;d、f、m和k独立地等于或大于0;BD1、BD2、BD3、BD4和BD5独立地是ALK4或ActRIIB多肽结构域,其中BD1、BD2、BD3和BD4的至少一个是ALK4多肽结构域和其中BD1、BD2、BD3和BD4的至少一个是ActRIIB多肽结构域,和接头1、接头2、接头3和接头4独立地大于或等于0。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB单链陷阱包含至少两种不同的ALK4多肽。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB单链陷阱包含至少两种不同的ActRIIB多肽。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB单链陷阱包含至少两种不同的接头。根据d、f、h、k、m和n的选择的值,异多聚体结构可包含以各种组合的大量重复单元,或可以是相对简单的结构。

[0341] 在另一个方面,本公开内容提供了异多聚体,其包含具有以下结构的多肽:

[0342] $\langle BD1 \rangle - \text{接头}1 - \langle BD2 \rangle$

[0343] 在又一方面,本公开内容提供了异多聚体,其包含具有以下结构的多肽:

[0344] $\langle BD1 \rangle - (\text{接头}2 - \langle BD2 \rangle)_n$

[0345] 其中n大于或等于1。

[0346] 本发明的另一方面提供了异多聚体,其包含具有以下结构的多肽:

[0347] $(\langle BD1 \rangle - \text{接头}1 - \langle BD1 \rangle)_f - \text{接头}2 - (\langle BD2 \rangle - \text{接头}3 - \langle BD3 \rangle)_g$

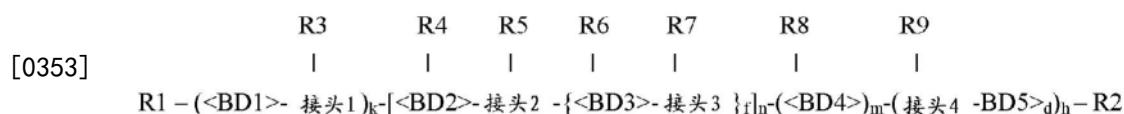
[0348] 其中f和g大于或等于1。

[0349] 在其中BD2和BD3相同和f和g是相同数字的实施方案中,这可产生围绕接头2的实质上镜像对称的结构,接头可存在差异。在其中BD2不同于BD3和/或其中f和g是不同数字的情况下,将产生不同的结构。根据本文的公开内容和本领域的知识选择合适的结合结构域、接头和重复频率在本领域普通技术人员的能力范围内。根据本公开内容的这样的单链配体陷阱的具体的非限制性实例在图11中图示提供。

[0350] 接头(1、2、3和4)可以是相同的或不同的。接头区提供了不同于 ALK4和ActRIIB的结构化配体-结合结构域的区段,因此可用于与附加分子(例如,可用于增加稳定性的分子,例如PEG化部分)缀合,无需化学修饰结合结构域。接头可包括非结构化的氨基酸序列,其可以与目的配体的受体或TGF- β 超家族的另一受体的细胞外部分中的天然非结构化区域的序列相同,或源自其保守修饰。在其它情况下,这样的接头在组成和来源上可以是完全人工的,但包含经选择以提供非结构化的柔性接头的氨基酸,当紧密靠近目的配体时其具有遇到静电或空间位阻复杂化的低可能性。当允许位于接头的每个N-和C-端上的结合结构域结合它们在其天然配体上的天然结合位点时,接头长度被认为是可接受的,使得配体以比通过仅结合一个结合结构域更高的亲和力与如此结合的两个结合结构域结合。在一些实例中,天然或人工来源的接头的氨基酸残基数量经选择为等于或大于同时(桥接)结合至ALK4和/或ActRIIB配体上的两个结合位点的最小需要距离。例如并且不希望以任何方式受到限制,接头长度可以为1-10个氨基酸、10-20个氨基酸、约18-80个氨基酸、25-60个氨基酸、35-45个氨基酸或任何其它合适的长度。

[0351] 接头可经设计以促进多肽的纯化。选择的准确纯化方案将决定需要什么样的修饰,例如和不希望受到限制,考虑添加纯化“标签”例如 His标签;在其它实例中,接头可包括促进添加货物或附加分子的区域。当这样的添加影响接头的非结构化性质或引入潜在的静电或空间顾虑时,进行接头长度的合适增加以确保两个结合结构域能够结合它们各自在配体上的位点。根据本文的方法和教导,本领域技术人员可常规进行这样的决定。

[0352] 此外,本发明的设计允许连接其它货物分子(例如成像剂,例如荧光分子)、毒素等。例如和不希望以任何方式受到限制,单链多肽可经修饰以添加一种或多种货物和/或附加分子(在本文统称为R1、R2、R3、R4等):



[0354] 不限制可用的R取代基的普遍性,R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9可以存在或可以不存在;当存在时,它们可以是相同的或不同的和可独立地是以下一种或多种:用于靶向的融合蛋白,例如但不限于例如抗体片段(例如,单链Fv)和/或单结构域抗体(sdAb);放射疗法和/或成像剂,例如但不限于放射性核素(例如, ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{57}Cu 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At)、荧光染料(例如, Alexa Fluor、Cy染料)和/或荧光蛋白标签(例如,GFP、DsRed);用于化学疗法的细胞毒性剂,例如但不限于多柔比星、卡奇霉素、类美登素衍生物(例如,DM1、DM4)、毒素(例如,截短的真菌毒素A、白喉毒素);基于纳米颗粒的载体,例如但不限于聚乙二醇(PEG)、缀合至药物的聚合物、纳米载体或成像剂(例如,聚合物N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、谷氨酸、PEG、葡聚糖);药物(例如,但不限于多柔比星、喜树碱、紫杉醇、palatinat);纳米载体,例如但不限于纳米外壳或脂质体;成像剂,例

如但不限于超磁氧化铁 (SPIO); 树枝状聚体; 和/或用于配体纯化、浓缩或隔离的固体支持物 (例如, 纳米颗粒、惰性树脂、合适的二氧化硅支持物)。

[0355] 一般而言, 不优选在所有可能的位置具有货物或附加分子, 因为这可引起空间或静电复杂化。然而, 按本文所教导的, 添加货物或附加分子至任何给定的一个或多个位置对结构的影响可根据本文的公开内容通过对在结合结构域之间的接头建模和进行分子动力学模拟常规确定, 以显著最小化分子力学能量和减少在接头和 ALK4 和 ActRIIB 多肽之间的空间和静电不相容性。

[0356] 可能优选添加货物或附加分子至试剂的接头部分, 而不是结合结构域, 以减少干扰结合功能的可能性。然而, 添加至结合结构域是可能的, 在一些情况下可能是理想的, 和这样的添加的影响可通过用按本文所述的提议的添加对结合剂和接头建模, 常规地预先确定。

[0357] 缀合方法可使用市售的试剂盒进行, 所述试剂盒能够通过常见的反应性基团, 例如伯胺、琥珀酰亚胺 (NHS) 酯和巯基-反应性基团进行缀合。一些非限制性实例是: Alexa Fluor 488 蛋白标记试剂盒 (Molecular Probes, Invitrogen detection technologies) 和 PEG 化试剂盒 (Pierce Biotechnology Inc.)。

[0358] 在某些方面, ALK4:ActRIIB 单链陷阱可与一种或多种 ALK4 或 ActRIIB 多肽以及另外的 ALK4:ActRIIB 单链配体陷阱共价或非共价缔合, 以形成更高级异多聚体, 其可根据本文所述的方法使用。参见例如, 图 12。例如, ALK4:ActRIIB 单链配体陷阱还可包含本文所述的多聚化结构域。在一些实施方案中, ALK4:ActRIIB 单链配体陷阱包含 Ig 免疫球蛋白的恒定结构域。这样的免疫球蛋白恒定结构域可经选择以促进包含至少一个单链 ALK4:ActRIIB 陷阱的对称或不对称的复合物。

[0359] 在某些方面, ALK4:ActRIIB 单链陷阱或这样的陷阱的组合可用作 ALK4:ActRIIB 拮抗剂以治疗或预防本文所述的 ALK4:ActRIIB 病症或疾病。

[0360] 应理解, 融合蛋白 (例如, 免疫球蛋白 Fc 融合蛋白) 的不同的元件可以与所需功能性一致的任何方式排列。例如, ALK4 和/或 ActRIIB 多肽结构域可位于异源结构域的 C-末端, 或者, 异源结构域可位于 ALK4 和/或 ActRIIB 多肽结构域的 C-末端。ALK4 和/或 ActRIIB 多肽结构域和异源结构域在融合蛋白中不需要相邻, 和另外的结构域或氨基酸序列可包括在任一结构域的 C-或 N-末端或在结构域之间。

[0361] 例如, ALK4 和/或 ActRIIB 受体融合蛋白可包含式 A-B-C 所示的氨基酸序列。B 部分对应于 ALK4 或 ActRIIB 多肽结构域。A 和 C 部分可独立地是零、一个或超过一个氨基酸, 和 A 和 C 部分二者当存在时对 B 是异源的。A 和/或 C 部分可通过接头序列连接至 B 部分。接头可以富含甘氨酸 (例如, 2-10、2-5、2-4、2-3 个甘氨酸残基) 或甘氨酸和脯氨酸残基, 和可例如包含苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单一序列, 或苏氨酸/丝氨酸和/或甘氨酸的重复序列, 例如, GGG (SEQ ID NO: 13)、GGGG (SEQ ID NO: 14)、TGGGG (SEQ ID NO: 15)、SGGGG (SEQ ID NO: 16)、TGGG (SEQ ID NO: 17)、SGGG (SEQ ID NO: 18) 或 GGGGS (SEQ ID NO: 58) 单一态或重复。在某些实施方案中, ALK4 和/或 ActRIIB 融合蛋白包含式 A-B-C 所示的氨基酸序列, 其中 A 是前导 (信号) 序列, B 由 ALK4 和/或 ActRIIB 多肽结构域组成, 和 C 是增强体内稳定性、体内半寿期、摄取/给药、组织定位或分布、蛋白复合物形成和/或纯化的一项或多项的多肽部分。在某些实施方案中, ALK4 和/或 ActRIIB 融合蛋白包含式 A-B-C 所示的氨基酸序列, 其中 A 是 TPA 前

导序列, B由ALK4或ActRIIB受体多肽结构域组成, 和 C是免疫球蛋白Fc结构域。优选的融合蛋白包含SEQ ID NOs: 39、41、42、44、45、46、47和48的任一个所示的氨基酸序列。

[0362] 在一些实施方案中, ALK4:ActRIIB异多聚体进一步包含一个或多个异源的部分(结构域)以赋予需要的性质。例如, 一些融合结构域可特别用于通过亲和色谱分离融合蛋白。这样的融合结构域的众所周知的实例包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。为了亲和纯化的目的, 使用亲和色谱的相关基质, 例如谷胱甘肽-、淀粉酶-和镍-或钴-缀合的树脂。许多这样的基质可以“试剂盒”的形式获得, 例如Pharmacia GST纯化系统和与(HIS)₆融合配偶体一起使用的QIAexpressTM系统(Qiagen)。作为另一实例, 融合结构域可经选择, 以促进配体陷阱多肽的检测。这样的检测结构域的实例包括各种荧光蛋白(例如, GFP)以及“表位标签”, 其通常是特异性抗体可利用的短的肽序列。特异性单克隆抗体可容易利用的众所周知的表位标签包括FLAG、流感病毒血球凝集素(HA)和c-myc标签。在一些情况下, 融合结构域具有蛋白酶裂解位点, 例如对于因子Xa或凝血酶, 其允许相关的蛋白酶部分地消化融合蛋白, 从而从其中释放重组蛋白。释放的蛋白然后可通过随后的色谱分离, 从融合结构域分离。

[0363] 在某些实施方案中, ALK4和/或ActRIIB多肽包含能够使多肽稳定的一种或多种修饰。例如, 这样的修饰增强多肽的体外半寿期, 增强多肽的循环半寿期和/或减少多肽的蛋白水解降解。这样的稳定修饰包括但不限于, 融合蛋白(包括例如, 包含ALK4和/或ActRIIB多肽结构域和稳定剂结构域的融合蛋白), 糖基化位点的修饰(包括例如, 添加糖基化位点至本公开内容的多肽)和糖部分的修饰(包括例如, 从本公开内容的多肽除去糖部分)。如本文所用的, 术语“稳定剂结构域”不仅是指融合蛋白的情况下的融合结构域(例如, 免疫球蛋白Fc结构域), 而且包括非蛋白性修饰, 例如糖部分或非蛋白性部分, 例如聚乙二醇。

[0364] 在优选的实施方案中, 根据本文所述的方法使用的ALK4:ActRIIB异多聚体是分离的复合物。如本文所用的, 分离的蛋白(或蛋白复合物)或多肽(或多肽复合物)是已经与其天然环境的组分分离的蛋白或多肽。在一些实施方案中, 本公开内容的异多聚体被纯化至大于95%、96%、97%、98%或99%纯度, 如通过例如, 电泳(例如, SDS-PAGE、等电点聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如, 离子交换或反相HPLC)所测定的。用于评估抗体纯度的方法是本领域众所周知的[Flatman等, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87]。在一些实施方案中, ALK4:ActRIIB异多聚体制备物基本上不含ALK4和/或ActRIIB同多聚体。例如, 在一些实施方案中, ALK4:ActRIIB异多聚体制备物包含小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%ALK4同多聚体。在一些实施方案中, ALK4:ActRIIB异多聚体制备物包含小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%ActRIIB同多聚体。在一些实施方案中, ALK4:ActRIIB异多聚体制备物包含小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%ALK4同多聚体和小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%ActRIIB同多聚体。

[0365] 在某些实施方案中, 本公开内容的ALK4和/或ActRIIB多肽以及包含它们的异多聚体可通过各种本领域已知的技术产生。例如, 多肽可使用标准蛋白化学技术合成, 例如描述于Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 和 Grant G.A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company,

New York (1992) 的那些。此外,自动肽合成仪可市售获得 (Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600)。或者,多肽,包括其片段或变体,可使用各种表达系统[大肠杆菌、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、COS细胞、杆状病毒]经重组产生,如本领域众所周知的。在进一步的实施方案中,修饰或未修饰的多肽可通过使用例如,蛋白酶,例如,胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶或配对的碱性氨基酸转换酶 (PACE),消化重组产生的全长ALK4和/或ActRIIB多肽而产生。计算机分析(使用市售可得的软件,例如,MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) 可用于鉴定蛋白水解裂解位点。

[0366] B. 编码ALK4和/或ActRIIB多肽的核酸

[0367] 在某些实施方案中,本公开内容提供了编码本文公开的ALK4和 /或ActRIIB受体(包括其片段、功能变体和融合蛋白)的分离和/或重组的核酸。例如,SEQ ID NO:11编码天然存在的人ALK4前体多肽,而SEQ ID NO:12编码ALK4的成熟的细胞外结构域。本发明的核酸可以是单链的或双链的。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可用于例如,制备本文描述的ALK4:ActRIIB异多聚体的方法。

[0368] 如本文所用的,分离的核酸是指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在正常包含核酸分子的细胞中包含的核酸分子,但所述核酸分子存在于染色体外或不同于其天然的染色体位置的染色体位置。

[0369] 在某些实施方案中,编码本公开内容的ALK4和/或ActRIIB多肽的核酸应理解为包括SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40或43 的任何一个以及其变体。变体核苷酸序列包括差异一个或多个核苷酸置换、添加或缺失的序列,包括等位基因变体,因此,将包括与SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40、43中任一指定的核苷酸序列不同的编码序列。

[0370] 在某些实施方案中,本公开内容的TGF β 超家族ALK4和/或 ActRIIB多肽由分离或重组核酸序列编码,其包含与SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40或43具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列,基本上由其组成或由其组成。本领域普通技术人员将理解包含对于与SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40或43具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列互补的序列,基本上由其组成或由其组成的核酸序列,也在本公开内容的范围内。在另外的实施方案中,本公开内容的核酸序列可为分离的、重组的,和/或与异源的核苷酸序列融合或在DNA文库中。

[0371] 在其它实施方案中,本公开内容的核酸还包括在严格性条件下与 SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40或43指定的核苷酸序列、SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40或43的互补序列或其片段杂交的核苷酸序列。本领域普通技术人员将容易理解,促进DNA杂交的合适的严格性条件可以改变。例如,可在6.0x氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 中在约45℃下进行杂交,接着在50℃下用2.0x SSC洗涤。例如,在洗涤步骤中盐浓度可选自在50℃下约2.0x SSC的低严格性至在50℃下约0.2x SSC的高严格性。此外,在洗涤步骤中温度可从在室温约22℃下的低严格性条件增加至在约65℃下的高严格性条件。温度和盐二者可以改变,或温度或盐浓度可以保持恒定,而改变其它变量。在一个实施方案中,本公开内容提供了核酸,其在室温下 6x SSC的低严格性条件下杂交,接着在室温下用2x SSC洗涤。

[0372] 由于遗传密码的简并性而不同于SEQ ID NOs:7、8、11、12、21、22、40或43所示的

核酸的分离的核酸也在本公开内容的范围内。例如,许多氨基酸由超过一个三联体指定。规定相同的氨基酸的密码子,或同物异名(例如,CAU和CAC是组氨酸的同物异名)可导致“沉默”突变,其不影响蛋白的氨基酸序列。然而,预期确实导致本发明的蛋白的氨基酸序列变化的DNA序列多态性将存在于哺乳动物细胞中。本领域技术人员将理解,由于天然等位基因变异,编码特定蛋白的核酸的一个或多个核苷酸(至多约3-5%的核苷酸)的这些变化可存在于给定物种的个体中。任何和所有这样的核苷酸变化和产生的氨基酸多态性在本公开内容的范围内。

[0373] 在某些实施方案中,本公开内容的重组核酸可以与在表达构建体中的一种或多种调节性核苷酸序列可操作连接。调节性核苷酸序列通常适合于用于表达的宿主细胞。对于各种宿主细胞,许多类型的合适表达载体和合适的调节性序列是本领域已知的。通常,所述一种或多种调节性核苷酸序列可包括但不限于,启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、和增强子或激活物序列。本公开内容设想了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子,或合并了超过一个启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可存在于细胞的附加体上,例如质粒,或表达构建体可插入染色体中。在一些实施方案中,表达载体包含可选择标记基因以允许选择转化的宿主细胞。可选择标记基因是本领域众所周知的和随使用的宿主细胞而改变。

[0374] 在某些方面,在表达载体中提供本发明的核酸,所述载体包含编码ALK4和/或ActRIIB多肽和可操作连接至至少一种调节性序列的核苷酸序列。调节性序列是公认的和经选择以指导ALK4和/或ActRIIB多肽的表达。因此,术语调节性序列包括启动子、增强子和其它表达控制元件。实例性调节性序列描述于Goeddel;Gene Expression Technology: Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,CA (1990)。例如,当与其可操作连接时控制DNA序列表达的各种表达控制序列的任何一种可用于这些载体以表达编码ALK4和/或ActRIIB多肽的DNA序列。这样的可用的表达控制序列包括例如,SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、表达受T7RNA聚合酶指导的T7启动子、噬菌体λ的主要操纵基因和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解的酶的启动子、酸性磷酸酶(例如,Pho5)的启动子、酵母α-交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子和已知控制原核或真核细胞或它们的病毒的基因表达的其它序列,和其各种组合。应理解,表达载体的设计可取决于例如待转化的宿主细胞的选择和/或需要表达的蛋白类型等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力和由载体编码的任何其它蛋白的表达,例如抗生素标记。

[0375] 本公开内容的重组核酸可通过将克隆的基因或其部分连接至适合于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽、昆虫或哺乳动物)或二者中表达的载体来产生。用于产生重组ALK4和/或ActRIIB多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括以下类型的质粒:pBR322-衍生的质粒、pEMBL-衍生的质粒、pEX-衍生的质粒、pBTac-衍生的质粒和pUC-衍生的质粒,用于在原核细胞例如大肠杆菌中表达。

[0376] 一些哺乳动物表达载体同时包含促进载体在细菌中增殖的原核序列和在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体是适合于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体的一些用来自细菌质粒、例如pBR322的

序列修饰,以促进在原核和真核细胞中复制和耐药性选择。或者,病毒例如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或爱泼斯坦-巴尔病毒(pHEBo、pREP-衍生和p205)的衍生株可用于在真核细胞中蛋白瞬时表达。其它病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可见于下文的基因疗法递送系统的描述。用于制备质粒和转化宿主生物体的各种方法是本领域众所周知的。对于原核和真核细胞二者的其它合适的表达系统,以及通用的重组程序[Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3版, Sambrook、Fritsch和Maniatis编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001]。在一些实例中,可能需要通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这样的杆状病毒表达系统的实例包括pVL-衍生的载体(例如 pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW-衍生的载体(例如pAcUW1)和pBlueBac-衍生的载体(例如包含 β -gal的pBlueBac III)。

[0377] 在优选的实施方案中,载体经设计以在CHO细胞中产生本发明的ALK4和/或ActRIIB多肽,例如Pcmv-Script载体(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)和pCI-neo载体(Promega, Madison, Wisc.)。如显而易见的,本发明的基因构建体可用于导致本发明的ALK4和/或ActRIIB多肽在培养物中增殖的细胞中表达,例如,以产生蛋白,包括融合蛋白或变体蛋白,用于纯化。

[0378] 本公开内容还涉及用重组基因转染的宿主细胞,所述基因包括一种或多种本发明的ALK4和/或ActRIIB多肽的编码序列。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,ALK4和/或ActRIIB多肽可在细菌细胞例如大肠杆菌、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞[例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系]中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0379] 因此,本公开内容还涉及产生本发明的ALK4和/或ActRIIB多肽的方法。例如,用编码ALK4和/或ActRIIB多肽的表达载体转染的宿主细胞可在合适的条件下培养,以允许表达ALK4和/或ActRIIB多肽发生。多肽可经分泌并从细胞和包含多肽的培养基的混合物分离。或者,ALK4和/或ActRIIB多肽可从获自收获和裂解的细胞的胞质或膜部分分离。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的合适培养基是本领域众所周知的。本发明的多肽可使用本领域已知用于纯化蛋白的技术从细胞培养基、宿主细胞或二者分离,所述技术包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳、用对ALK4和/或ActRIIB多肽的特定表位特异性的抗体的免疫亲和纯化、和用结合融合至ALK4和/或ActRIIB多肽的结构域的试剂的亲和纯化(例如,蛋白A柱可用于纯化ALK4-Fc和/或ActRIIB-Fc融合蛋白)。在一些实施方案中,ALK4和/或ActRIIB多肽是包含促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0380] 在一些实施方案中,纯化通过一系列柱色谱步骤实现,包括例如,以任何次序的以下的三种或更多种:蛋白A色谱、Q sepharose色谱、phenylsepharose色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。ALK4和/或ActRIIB多肽以及其融合蛋白可纯化至>90%、>95%、>96%、>98%或>99%的纯度,如通过尺寸排阻色谱所测定的,和>90%、>95%、>96%、>98%或>99%的纯度,如通过SDS PAGE所测定的。目标水平的纯度应该是足以在哺乳动物系统、特别是非-人灵长类动物、啮齿动物(小鼠)和人中实现需要的结果的纯度。

[0381] 在另一实施方案中,编码在重组ALK4和/或ActRIIB多肽的所需部分的N-末端的纯化前导序列、例如聚-(His)/肠激酶裂解位点序列的融合基因,可允许通过亲和色谱使用

Ni²⁺金属树脂纯化表达的融合蛋白。然后纯化前导序列可随后通过用肠激酶处理除去,以提供纯化的 ALK4和/或ActRIIB多肽以及其异多聚体[Hochuli等(1987) J. Chromatography 411:177;和Janknecht等(1991) PNAS USA 88:8972]。

[0382] 用于制备融合基因的技术是众所周知的。基本上,编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接根据常规技术进行,使用平端或交错末端连接,限制性酶消化以提供合适的末端,合适时粘端填充,碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接,和酶连接。在另一实施方案中,融合基因可通过常规技术合成,包括自动DNA合成仪。或者,基因片段的PCR扩增可使用锚定引物进行,其在两个相邻的基因片段之间产生互补的突出端,其可随后被退火以产生嵌合基因序列。参见例如, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等编辑, John Wiley & Sons:1992。

[0383] C. 抗体拮抗剂

[0384] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂是抗体(ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体)或抗体的组合。ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合可结合例如,一种或多种ALK4配体、ActRIIB配体、ALK4:ActRIIB-结合配体、ALK4受体、ActRIIB受体和/或一种或多种TGF- β 超家族共受体。如本文所述的,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体可单独或与一种或多种支持性疗法或活性剂组合使用,以治疗有需要的受试者(例如,具有骨-相关疾病或病况、肌肉相关疾病或病况,或与过量或不需要的脂肪有关的疾病或病况的受试者)。

[0385] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是抑制与 ALK4:ActRIIB异多聚体结合或可能结合的一种或多种配体,例如活化素B、GDF11、活化素A、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合结合至少一种这样的配体。例如,如本文所用的,活化素B抗体(或抗-活化素B抗体)通常是指可以足够的亲和力结合活化素B使得抗体可用作靶向活化素B的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,活化素B抗体与不相关的非-活化素B蛋白的结合程度小于所述抗体与活化素B的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,活化素B抗体结合在不同物种的活化素B中保守的活化素B的表位。在某些优选的实施方案中,抗-活化素B抗体结合人活化素B。在一些实施方案中,活化素B抗体可抑制活化素B免于结合至I型和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4),因此抑制活化素B-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,活化素B抗体可抑制活化素B免于结合至共受体,因此抑制活化素B-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,活化素B与活化素A、C和E享有一些序列同源性,因此结合活化素B的抗体在一些情况下还可结合和/或抑制另一活化素。在一些实施方案中,本公开内容涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和其用途,其结合例如活化素B和进一步结合例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素AB和活化素B)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,结合活化素B的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,以大于 1×10^{-7} M的K_D结合BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M)。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含结合例如,两种或更多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例

如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体的抗体的组合。在一些实施方案中,抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0386] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制GDF8的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合GDF8。如本文所用的,GDF8抗体(或抗-GDF8抗体)通常是指以足够的亲和力结合GDF8使得所述抗体可用作靶向GDF8的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,GDF8抗体与不相关的非GDF8蛋白的结合程度小于所述抗体与GDF8的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,GDF8抗体结合在不同物种的GDF8中保守的GDF8的表位。在某些优选的实施方案中,抗-GDF8抗体结合人GDF8。在一些实施方案中,GDF8抗体可抑制GDF8免于结合至I型和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4),因此抑制GDF8-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,GDF8抗体可抑制GDF8免于结合共受体,因此抑制GDF8-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,GDF8与GDF11具有高度序列同源性,因此结合GDF8的抗体在一些情况下还可结合和/或抑制GDF11。在一些实施方案中,本公开内容涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和其用途,其结合GDF8和进一步结合至例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、BMP10、BMP6和GDF3]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,结合GDF8的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,以大于 1×10^{-7} M的 K_D 结合BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M)。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含GDF8抗体和一种或多种另外的抗体,所述另外的抗体结合例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF3、BMP6和BMP10]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,包含GDF8抗体的抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0387] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制GDF11的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合GDF11。如本文所用的,GDF11抗体(或抗-GDF11抗体)通常是指以足够的亲和力结合GDF11使得所述抗体可用作靶向GDF11的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,GDF11抗体与不相关的非-GDF11蛋白的结合程度小于所述抗体与GDF11的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,GDF11抗体结合在不同物种的GDF11中保守的GDF11的表位。在某些优选的实施方案中,抗-GDF11抗体结合人GDF11。在一些实施方案中,GDF11抗体可抑制GDF11免于结合至I型和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4),因此抑制GDF11-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,GDF11抗体可抑制GDF11免于结合共受体,因此抑制GDF11-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,GDF11与GDF8具有高度序列同源性,因此结合GDF11的抗体在一些情况下还可结合和/或抑制GDF8。在一些实施方案中,本公开内容涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗

体)和其用途,其结合 GDF11和进一步结合至例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,结合GDF11的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,以大于 1×10^{-7} M的 K_D 结合BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M)。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含GDF11抗体和一种或多种另外的抗体,所述另外的抗体结合例如,一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、GDF3、BMP6和BMP10]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,包含GDF11抗体的抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0388] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制GDF3的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合GDF3。如本文所用的,GDF3抗体(或抗-GDF3抗体)通常是指以足够的亲和力结合GDF3使得所述抗体可用作靶向GDF3的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,GDF3抗体与不相关的非-GDF3蛋白的结合程度小于所述抗体与GDF3的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,GDF3抗体结合在不同物种的GDF3中保守的GDF3的表位。在某些优选的实施方案中,抗-GDF3抗体结合人GDF3。在一些实施方案中,GDF3抗体可抑制GDF3免于结合至I型和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4),因此抑制GDF3-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,GDF3抗体可抑制GDF3免于结合共受体,因此抑制GDF3-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,本公开内容涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和其用途,其结合GDF3和进一步结合至例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、BMP10、BMP6和GDF11]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,结合GDF3的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,以大于 1×10^{-7} M的 K_D 结合BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M)。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含GDF3抗体和一种或多种另外的抗体,所述另外的抗体结合例如,一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、GDF11、BMP6和BMP10]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,包含GDF3抗体的抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0389] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP6的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合BMP6。如本文所用的,BMP6抗体(或抗-BMP6抗体)通常是指以足够的亲和力结合BMP6使得所述抗体可用作靶向BMP6的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,BMP6抗体与不相关的非-BMP6蛋白的结合程度小于所述抗体与BMP6的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和

力测定法所测量的。在某些实施方案中，BMP6抗体结合在不同物种的BMP6中保守的BMP6的表位。在某些优选的实施方案中，抗-BMP6抗体结合人BMP6。在一些实施方案中，BMP6抗体可抑制 BMP6免于结合至I型和/或II型受体（例如，ActRIIB和/或ALK4），因此抑制BMP6-介导的信号传导（例如，Smad信号传导）。在一些实施方案中，BMP6抗体可抑制BMP6免于结合共受体，因此抑制BMP6-介导的信号传导（例如，Smad信号传导）。在一些实施方案中，本公开内容涉及多特异性抗体（例如，双特异性抗体）和其用途，其结合BMP6 和进一步结合至例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如，活化素（例如，活化素A、活化素B和活化素AB）、GDF8、BMP10、GDF3和GDF11]、一种或多种I型受体和/或II型受体（例如，ActRIIB和/或ALK4）和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中，结合BMP6的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9（例如，以大于 1×10^{-7} M的 K_D 结合BMP9或具有相对适度的结合，例如，约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M）。在一些实施方案中，本公开内容涉及抗体的组合和其用途，其中抗体的组合包含BMP6抗体和一种或多种另外的抗体，所述另外的抗体结合例如，一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如，活化素（例如，活化素A、活化素B和活化素AB）、GDF8、GDF11、GDF3 和BMP10]、一种或多种I型受体和/或II型受体（例如，ActRIIB和/或ALK4）和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中，包含BMP6 抗体的抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0390] 在某些方面，ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP10的抗体。因此，在一些实施方案中，ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合BMP10。如本文所用的，BMP10抗体（或抗-BMP10抗体）通常是指以足够的亲和力结合BMP10使得所述抗体可用作靶向BMP10的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中，BMP10抗体与不相关的非-BMP10蛋白的结合程度小于所述抗体与 BMP10的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%，如通过例如放射免疫测定法（RIA）、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中，BMP10 抗体结合在不同物种的BMP10中保守的BMP10的表位。在某些优选的实施方案中，抗-BMP10抗体结合人BMP10。在一些实施方案中，BMP10抗体可抑制BMP10免于结合至I型和/或II型受体（例如，ActRIIB和/或ALK4），因此抑制BMP10-介导的信号传导（例如，Smad 信号传导）。在一些实施方案中，BMP10抗体可抑制BMP10免于结合共受体，因此抑制BMP10-介导的信号传导（例如，Smad信号传导）。在一些实施方案中，本公开内容涉及多特异性抗体（例如，双特异性抗体）和其用途，其结合BMP10和进一步结合至例如一种或多种结合 ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如，活化素（例如，活化素A、活化素B和活化素AB）、GDF8、BMP6、GDF3和GDF11]、一种或多种I型受体和/或II型受体（例如，ActRIIB和/或ALK4）和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中，结合BMP10的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9（例如，以大于 1×10^{-7} M的 K_D 结合 BMP9或具有相对适度的结合，例如，约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M）。在一些实施方案中，本公开内容涉及抗体的组合和其用途，其中抗体的组合包含BMP10抗体和一种或多种另外的抗体，所述另外的抗体结合例如，一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如，活化素（例如，活化素A、活化素B和活化素AB）、GDF8、GDF11、GDF3和BMP6]、一种或多种I型受体和/或II型受体（例如，ActRIIB和/或ALK4）和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中，包含BMP10抗体的抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0391] 在某些方面，ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制活化素（活化素

A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、活化素AE、活化素BC和/或活化素BE)的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合活化素(活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、活化素AE、活化素BC和/或活化素BE)。如本文所用的,活化素抗体(或抗-活化素抗体)通常是指可以足够的亲和力结合一种形式的活化素使得所述抗体可用作靶向该形式的活化素的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,活化素抗体与不相关的非-活化素蛋白的结合程度小于所述抗体与活化素的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,活化素抗体结合在不同物种的活化素中保守的活化素的表位。在某些优选的实施方案中,抗-活化素抗体结合人活化素。在其它优选的实施方案中,活化素抗体可抑制活化素免于结合 I型和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4),因此抑制活化素-介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素B。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素A。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素A和活化素B。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素AB。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素C。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素E。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素A和活化素C。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素AC。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素A和活化素E。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素AE。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素B和活化素C。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素BC。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素B和活化素E。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素BE。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素A、活化素B和活化素C。在一些实施方案中,活化素抗体结合活化素A、活化素B和活化素E。任选地,结合活化素A、活化素B和活化素C的一种或多种的活化素抗体可进一步结合活化素E。在一些实施方案中,本公开内容涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和其用途,其结合活化素和进一步结合至例如一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,结合活化素的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,以大于 1×10^{-7} M的 K_D 结合BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 1×10^{-8} M或约 1×10^{-9} M。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含活化素抗体和一种或多种另外的抗体,所述另外的抗体结合例如,一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的另外的TGF- β 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、GDF3、BMP6和BMP10]、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体。在一些实施方案中,包含活化素抗体的抗体的组合不包含BMP9抗体。

[0392] 关于结合和拮抗结合ALK4:ActRIIB的配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、GDF3、BMP6、GDF11和BMP10]的抗体,考虑了抗体可被设计为双特异性抗体,其包含结合这样的配体的表位使得抗体的第一部分与I型受体竞争结合的第一部分,和包含结合这样的配体的表位使得抗体的第二部分与II型受体竞争结合的第二部分。以此方式,靶向单一配体的双特异性抗体可经设计以模拟可由ALK4:ActRIIB异多聚体赋予的双重I型-II型受体结合阻断。类似地,考虑了相同效果可使用两种或更多种抗体的组合实现,其中至少第一抗体结合这样的配体的表位,使得第一抗体与I型受体竞争结合,和至少第二

抗体结合这样的配体的表位,使得第二抗体与II型受体竞争结合。

[0393] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制ActRIIB的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合至少结合ActRIIB。如本文所用的,ActRIIB抗体(抗-ActRIIB抗体)通常是指以足够的亲和力结合ActRIIB使得所述抗体可用作靶向ActRIIB的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,抗-ActRIIB抗体与不相关的非-ActRIIB蛋白的结合程度小于所述抗体与ActRIIB的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白-蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,抗-ActRIIB抗体结合在不同物种的ActRIIB中保守的ActRIIB的表位。在某些优选的实施方案中,抗-ActRIIB抗体结合人ActRIIB。在一些实施方案中,抗-ActRIIB抗体可抑制一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,GDF8、活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF3、BMP6和BMP10]免于结合ActRIIB和/或ALK4。在一些实施方案中,抗-ActRIIB抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),其结合ActRIIB和一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF3、BMP6和BMP10]、I型受体(例如,ALK4)、共受体和/或另外的II型受体。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含抗-ActRIIB抗体和一种或多种另外的抗体,所述另外的抗体结合例如,一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF3、BMP6、BMP10、nodal和BMP9]、共受体、I型受体(例如,ALK4)和/或另外的II型受体。应注意,ActRIIB与ActRIIA具有序列相似性,因此结合ActRIIB的抗体在一些情况下还可结合和/或抑制ActRIIA。

[0394] 在某些方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制ALK4的抗体。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂抗体或抗体的组合结合至少ALK4。如本文所用的,ALK4抗体(抗-ALK4抗体)通常是指以足够的亲和力结合ALK4使得所述抗体可用作靶向ALK4的诊断剂和/或治疗剂的抗体。在某些实施方案中,抗-ALK4抗体与不相关的非-ALK4蛋白的结合程度小于所述抗体与ALK4的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)、Biacore或其它蛋白-蛋白相互作用或结合亲和力测定法所测量的。在某些实施方案中,抗-ALK4抗体结合在不同物种的ALK4中保守的ALK4的表位。在某些优选的实施方案中,抗-ALK4抗体结合人ALK4。在一些实施方案中,抗-ALK4抗体可抑制一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF3、BMP6和BMP10]免于结合I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIB)或共受体。在一些实施方案中,抗-ALK4抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),其结合ALK4和一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]、II型受体(例如,ActRIIB)、共受体和/或另外的I型受体。在一些实施方案中,本公开内容涉及抗体的组合和其用途,其中抗体的组合包含抗-ALK4抗体和一种或多种另外的抗体,所述另外的抗体结合例如,一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]、共受体、另外的I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIB)。

[0395] 本文所述的,存在产生异多聚体的各种方法。这样的方法可用于产生异多聚体,其包含抗体-结合结构域(例如, V_L 和 V_H 链的复合物)和一种或多种选自ALK4多肽、ActRIIB多肽、ALK4:ActRIIB异聚体或ALK4:ActRIIB单一陷阱多肽的多肽。参见图10和12D。例如,在一些实施方案中,本公开内容提供了蛋白复合物,其包含与ALK4多肽共价或非共价缔合的结合ALK4:ActRIIB-结合配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]的抗体的配体-结合结构域。在一些实施方案中,本公开内容提供了蛋白复合物,其包含与ActRIIB多肽共价或非共价缔合的结合ALK4:ActRIIB-结合配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]的抗体的配体-结合结构域。在一些实施方案中,本公开内容提供了蛋白复合物,其包含与ALK4:ActRIIB单链配体陷阱共价或非共价缔合的结合ALK4:ActRIIB-结合配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]的抗体的配体-结合结构域。在一些实施方案中,本公开内容提供了蛋白复合物,其包含与ALK4:ActRIIB异多聚体共价或非共价缔合的结合ALK4:ActRIIB-结合配体的抗体的配体-结合结构域。

[0396] 术语抗体在本文以最广含义使用,涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示需要的抗原-结合活性。抗体片段是指并非完整抗体的分子,其包含结合完整抗体所结合的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和自抗体片段形成的多特异性抗体[参见例如,Hudson等(2003)Nat.Med.9:129-134;Plückthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg和Moore编辑,(Springer-Verlag,New York),pp.269-315 (1994);WO 93/16185;和美国专利号5,571,894;5,587,458;和5,869,046]。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的[参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等(2003)Nat. Med.9:129-134(2003);和Hollinger等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448]。三抗体和四抗体也描述于Hudson等(2003)Nat.Med. 9:129-134。单-结构域抗体是包含抗体的所有或一部分重链可变结构域或所有或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单-结构域抗体是人单-结构域抗体[参见例如,美国专利号6,248,516]。本文公开的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在某些实施方案中,本公开内容的抗体包含与其连接和能够被检测的标记(例如,标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗体是分离的抗体。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗体是重组抗体。

[0397] 本文的抗体可具有任何类型。抗体的类型是指其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在5个主要类型的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,若干这些类型可进一步分为亚类(同种型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定结构域被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0398] 一般而言,用于本文公开的方法的抗体特异性结合其靶标抗原,优选地具有高结合亲和力。亲和力可表示为K_D值,反映了固有结合亲和力(例如,具有最小的亲合力作用)。通常,结合亲和力经体外测量,无论是在无细胞还是细胞相关的条件下。本领域已知的许多测定法的任一种,包括本文公开的那些,可用于获得结合亲力度量,包括例如,Biacore、放射性标记的抗原-结合测定法(RIA)和ELISA。在一些实施方案中,本公开内容的抗体以至

少 1×10^{-7} 或更强、 1×10^{-8} 或更强、 1×10^{-9} 或更强、 1×10^{-10} 或更强、 1×10^{-11} 或更强、 1×10^{-12} 或更强、 1×10^{-13} 或更强或 1×10^{-14} 或更强的 K_D 结合它们的靶标抗原(例如,ALK4、ActRIIB、活化素A、活化素B、活化素AB、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3)。

[0399] 在某些实施方案中, K_D 通过以Fab形式的目的抗体和其靶标抗原进行的RIA测量,如以下测定法所述的。Fab对抗原的溶液结合亲和力通过在滴定系列的未标记抗原的存在下用最小浓度的放射性标记的抗原(例如, ^{125}I -标记)平衡Fab,然后用抗-Fab抗体-包被的板捕获结合的抗原来测量[参见例如,Chen等(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]。为了建立该测定的条件,多孔板(例如, **MICROTITER**[®], 来自Thermo Scientific)用捕获性抗-Fab抗体(例如,来自Cappel Labs)包被(例如,过夜)和随后用牛血清白蛋白封闭,优选地在室温下(大约23℃)。在非-吸附板中,放射性标记的抗原与系列稀释的目的Fab混合[例如,与抗-VEGF抗体Fab-12的评价一致,Presta等,(1997) Cancer Res. 57:4593-4599]。然后将目的Fab孵育,优选地过夜,但孵育可持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。之后,将混合物转移至捕获板以孵育,优选地在室温下约1小时。然后除去溶液,并将板洗涤数次,优选地用聚山梨醇酯20和PBS混合物。当板已经干燥时,加入闪烁剂(例如, **MICROSCINT**[®], 来自Packard)并将板在 γ 计数器(例如, **TOPCOUNT**[®], 来自Packard)上计数。

[0400] 根据另一实施方案, K_D 使用表面等离子体共振测定法,使用例如**BIACORE**[®] 2000或**BIACORE**[®] 3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) 用约10个响应单位(RU)的固定抗原CM5芯片测量。简言之,羧基甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)根据供应商的说明书活化。例如,抗原可用10mM乙酸钠pH 4.8稀释至 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ (约 $0.2\mu\text{M}$),然后以 $5\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射以实现大约10个响应单位(RU)的偶联蛋白。在注射抗原后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学度量,以大约 $25\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速注射在含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20[®])表面活性剂的PBS(PBST)中的2倍系列稀释的Fab(0.78nM 至 500nM)。缔合速率(k_{on})和离解速率(k_{off})使用例如,简单的一对一Langmuir结合模型(**BIACORE**[®] Evaluation 软件版本3.2),通过同时拟合缔合和离解传感图谱计算。平衡离解常数(K_D)计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ [参见例如,Chen等,(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]。如果通过上述表面等离子体共振测定法,缔合速率超过例如, $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则缔合速率可通过使用测量在增加浓度的抗原的存在下20nM抗-抗原抗体(Fab形式)/PBS的荧光发射强度的增加或减少(例如,激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的荧光淬灭技术测定,如在带有搅拌杯的分光计,例如停流装备的分光光度计(Aviv Instruments)或8000-系列SLM-**AMINCO**[®]分光光度计(ThermoSpectronic)中测量的。

[0401] 抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于蛋白水解消化完整抗体以及通过重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述的。人GDF11、活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、GDF8、BMP6、ActRIIB、ALK4、GDF3和BMP9的核酸和氨基酸序列是本领域众所周知的。此外,许多产生抗体的方法是本领域众所周知的,其中一些在本文中描述。因此,根据本公开内容使用的抗体拮抗剂可由本领域技术人员,基于本领域的知识和本文提供的

教导常规制备。

[0402] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。嵌合抗体是指其中重链和/或轻链的一部分源自特定的来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种的抗体。某些嵌合抗体描述于例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等,(1984) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*,81:6851-6855。在一些实施方案中,嵌合抗体包含非-人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非-人灵长类例如猴的可变区)和人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类型或亚类已从亲本抗体改变。一般而言,嵌合抗体包括其抗原-结合片段。

[0403] 在某些实施方案中,本文提供的嵌合抗体是人源化抗体。人源化抗体是指包含来自非-人超变区(HVR)的氨基酸残基和来自人框架区(FR)的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体包含基本上所有的至少一个和通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非-人抗体的那些,和所有或基本上所有的FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可至少包含源自人抗体的抗体恒定区的一部分。“人源化形式”的抗体,例如,非-人抗体,是指已经过人源化的抗体。人源化抗体和制备它们的方法综述于例如,Almagro和Fransson(2008) *Front.Biosci.* 13:1619-1633和进一步描述于例如,Riechmann等,(1988) *Nature* 332:323-329;Queen等(1989) *Proc. Nat'l Acad.Sci.USA* 86:10029-10033;美国专利号5,821,337; 7,527,791;6,982,321;和7,087,409;Kashmiri等,(2005) *Methods* 36:25-34[描述了SDR(a-CDR)移植];Padlan,*Mol.Immunol.* (1991) 28:489-498(描述了“表面重建”);Dall'Acqua等(2005) *Methods* 36:43-60(描述了“FR改组”);Osbourne等(2005) *Methods* 36:61-68;和 Klimka等*Br.J.Cancer* (2000) 83:252-260(描述了FR改组的“引导选择”方法)。可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区[参见例如,Sims等(1993) *J.Immunol.* 151:2296];源自特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区[参见例如,Carter等(1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,89:4285;和Presta等(1993) *J.Immunol.*,151:2623];人成熟的(体细胞成熟)框架区或人种系框架区[参见例如,Almagro和Fransson(2008) *Front.Biosci.* 13:1619-1633];和源自筛选FR文库的框架区[参见例如,Baca等,(1997) *J.Biol.Chem.* 272:10678-10684;和Rosok等,(1996) *J.Biol.Chem.* 271:22611-22618]。

[0404] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。人抗体可使用本领域已知的各种技术产生。人抗体总体描述于van Dijk和van de Winkel(2008) *Curr.Opin.Pharmacol.* 5:368-74(2001)和Lonberg,*Curr. Opin.Immunol.* 20:450-459。例如,人抗体可通过给予免疫原(例如,GDF11多肽、活化素B多肽、ActRIIA多肽或ActRIIB多肽)至转基因动物来制备,所述转基因动物已经修饰以在响应抗原攻击时产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常包含所有或一部分的人免疫球蛋白基因座,其替换了内源免疫球蛋白基因座或其染色体存在或随机整合至动物的染色体。在这样的转基因动物中,内源免疫球蛋白基因座总体上已被失活。对于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见例如,Lonberg(2005) *Nat.Biotech.* 23:1117-1125;美国专利号6,075,181和6,150,584(描述了XENOMOUSE™技术);美国专利号5,770,429(描述了HuMab®技术);美国专利号7,041,870(描述了K-M MOUSE®技术);和美国专利申请公开号2007/0061900(描述了

VelociMouse[®]技术)。来自由这样的动物产生的完整抗体的人可变区可被进一步修饰,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0405] 本文提供的人抗体还可通过基于杂交瘤的方法制备。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系已有描述[参见例如, Kozbor J.Immunol., (1984) 133: 3001; Brodeur等(1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; 和Boerner等(1991) J.Immunol., 147:86]。通过人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体还描述于Li等, (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562。另外的方法包括描述于例如, 美国专利号7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26 (4): 265-268 (2006) (描述了人-人杂交瘤) 中的那些。人杂交瘤技术 (Trioma技术) 还描述于 Vollmers和 Brandlein (2005) Histol. Histopathol., 20 (3): 927-937 (2005) 和Vollmers和Brandlein (2005) Methods Find Exp. Clin. Pharmacol., 27 (3): 185-91。本文提供的人抗体还可通过分离选自人-衍生的噬菌体展示文库的Fv 克隆可变-结构域序列产生。这样的可变-结构域序列然后可与需要的人恒定结构域组合。从抗体文库选择人抗体的技术是本领域已知的和在本文描述。

[0406] 例如, 本公开内容的抗体可通过筛选组合文库的具有所需的一种或多种活性的抗体分离。产生噬菌体展示文库和筛选这样的文库的具有所需结合特征的抗体的各种方法是本领域已知的。这样的方法综述于例如, Hoogenboom等(2001)的Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien等编辑, Human Press, Totowa, N.J. 和进一步描述于例如, McCafferty等(1991) Nature 348:552-554; Clackson等, (1991) Nature 352:624-628; Marks等(1992) J. Mol. Biol. 222:581-597; Marks 和Bradbury (2003)的Methods in Molecular Biology 248:161-175, Lo编辑, Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu等(2004) J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310; Lee等(2004) J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093; Fellouse (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472; 和Lee等(2004) J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132。

[0407] 在某些噬菌体展示方法中, VH和VL基因库分别通过聚合酶链反应 (PCR) 克隆和在噬菌体文库中随机重组, 其然后可对于抗原-结合噬菌体进行筛选, 如描述于Winter等(1994) Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455。噬菌体通常作为单链Fv (scFv) 片段或作为Fab片段展示抗体片段。来自免疫来源的文库提供对免疫原 (例如, GDF11、活化素B、ALK4或ActRIIB) 的高-亲和力抗体, 不需要构建杂交瘤。或者, 天然库可被克隆 (例如, 从人) 以提供对各种非-自身以及自身抗原的单一来源的抗体, 不需要任何免疫, 如描述于Griffiths等(1993) EMBO J, 12: 725-734。最后, 天然文库还可通过从干细胞克隆未重排V-基因区段和使用包含随机序列的PCR引物合成制备, 以编码高度可变的CDR3 区和实现体外重排, 如描述于Hoogenboom和Winter (1992) J. Mol. Biol., 227:381-388。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括例如: 美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0408] 在某些实施方案中, 本文提供的抗体是多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体。多特异性抗体 (通常单克隆抗体) 具有对一种或多种 (例如, 两种、三种、四种、五种、六种或更多

种)抗原上的至少两个不同的表位(例如,两个、三个、四个、五个或六个或更多个)的结合特异性。

[0409] 制备多特异性抗体的技术包括但不限于,具有不同的特异性的两个免疫球蛋白重链/轻链对的重组共表达[参见例如,Milstein和Cuello (1983) *Nature* 305:537;国际专利公开号W0 93/08829;和Traunecker 等(1991) *EMBO J.* 10:3655和美国专利号5,731,168(“结进孔”工程改造)]。多特异性抗体还可通过用于制备抗体Fc-异二聚体分子的工程改造静电导引作用(参见例如,W0 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段[参见例如,美国专利号4,676,980;和Brennan等(1985) *Science*, 229:81];使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体[参见例如, Kostelny等(1992) *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553];使用“双抗体”技术以制备双特异性抗体片段[参见例如,Hollinger等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448];使用单链Fv (sFv) 二聚体[参见例如, Gruber等(1994) *J. Immunol.*, 152:5368];和制备三特异性抗体(参见例如,Tutt等(1991) *J. Immunol.* 147:60) 制备。多特异性抗体可作为全长抗体或抗体片段制备。具有三个或更多个功能抗原结合位点的工程改造的抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”,也包括在本文中[参见例如,US 2006/0025576A1]。

[0410] 在某些实施方案中,本文公开的抗体是单克隆抗体。单克隆抗体是指获自一群基本上同质的抗体的抗体,即,包含该群的单个抗体是相同的和/或结合相同的表位,除了可能的变体抗体之外,例如,包含天然存在的突变或在产生单克隆抗体制备物期间产生,这样的变体通常以少量存在。与通常包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制备物形成对比,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单一表位。因此,修饰语“单克隆”表示获自抗体的基本同质群的抗体的特性和不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明的方法使用的单克隆抗体可通过各种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用包含所有或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,这样的方法和制备单克隆抗体的其它实例性方法在本文中描述。

[0411] 例如,通过使用源自GDF11的免疫原,抗-蛋白/抗-肽抗血清或单克隆抗体可通过标准方案制备[参见例如, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 由Harlow和Lane编辑(1988) Cold Spring Harbor Press:1988]。哺乳动物,例如小鼠、仓鼠或兔,可用免疫原性形式的GDF11多肽(一种能够引发抗体反应的抗原片段)或融合蛋白免疫。赋予蛋白或肽免疫原性的技术包括与载体缀合或本领域熟知的其它技术。GDF11多肽的免疫原性部分可在佐剂的存在下给予。免疫进展可通过检测血浆或血清中的抗体滴度来监测。用作为抗原的免疫原,标准ELISA或其它免疫测定法可用于评价抗体产生水平和/或结合亲和力水平。

[0412] 用GDF11的抗原制备物免疫动物后,可获得抗血清,并且如果需要,可从血清分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,产生抗体的细胞(淋巴细胞)可自免疫的动物收获,和通过标准体细胞融合程序与永生细胞例如骨髓瘤细胞融合,得到杂交瘤细胞。这样的技术是本领域众所周知的和包括例如,杂交瘤技术[参见例如,Kohler和Milstein (1975) *Nature*, 256:495-497]、人B细胞杂交瘤技术[参见例如,Kozbar 等(1983) *Immunology Today*, 4:72]和产生人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术[Cole等(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96]。杂交瘤细胞可经免疫化学筛选以产生与GDF11 多肽特异性反应的抗体和从包含这样的杂交瘤细胞的培养物分离单克隆抗体。

[0413] 在某些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰可引入至本文提供的抗体的Fc区,从而产生Fc区变体。Fc区变体可包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,置换、缺失和/或添加)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0414] 例如,本公开内容考虑了具有一些但并非所有效应功能的抗体变体,对于其中抗体体内半寿期是重要的但某些效应功能[例如,补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)]是不需要的或有害的应用,这使得它成为理想的候选物。可进行体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的减少/耗尽。例如,可进行Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞,NK细胞,仅表达Fc γ RIII,但单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。生血细胞上FcR表达概述于例如,Ravetch和Kinet(1991)Annu.Rev.Immunol. 9:457-492。评价目的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362; Hellstrom,I.等(1986)Proc.Natl.Acad. Sci.USA 83:7059-7063];Hellstrom,I等(1985)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82:1499-1502;美国专利号5,821,337;Bruggemann,M.等(1987) J.Exp.Med.166:1351-1361。或者,可使用非-放射性测定方法(例如,ACT1TM,用于流式细胞术的非-放射性细胞毒性测定法; CellTechnology,Inc.Mountain View,Calif.; 和CytoTox96[®]非-放射性细胞毒性测定法,Promega,Madison,Wis.)。可用于这样的测定法的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者,或另外,目的分子的ADCC活性可体内评价,例如,在动物模型中,例如公开于Clynes等(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656。也可进行C1q结合测定法以证实抗体不能结合C1q和因此缺少CDC活性[参见例如,C1q和C3c结合ELISA,WO 2006/029879和WO 2005/100402]。为了评价补体活化,可进行CDC测定法[参见例如,Gazzano-Santoro等(1996)J.Immunol.Methods 202:163;Cragg,M.S.等(2003)Blood 101:1045-1052;和Cragg,M.S和M.J.Glennie(2004) Blood 103:2738-2743]。FcRn结合和体内清除率/半寿期测定也可使用本领域已知的方法进行[参见例如,Petkova,S.B.等(2006)Intl. Immunol.18(12): 1759-1769]。具有减少的效应功能的本公开内容的抗体包括其中Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的一个或多个被置换的那些(美国专利号6,737,056)。这样的Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327的两个或更多个处具有置换的Fc突变体,包括残基265和297置换为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0415] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程改造的抗体,例如,“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中,置换的残基出现在抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸置换这些残基,反应性硫醇基团从而位于抗体的可接近位点,可用于使抗体与其它部分例如药物部分或接头-药物部分缀合,以产生免疫缀合物,如本文进一步描述的。在某些实施方案中,任何一种或多种以下残基可被半胱氨酸置换:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程改造的抗体可按例如美国专利号7,521,541中所述产生。

[0416] 此外,用于筛选抗体以鉴定需要的抗体的技术可影响获得的抗体的性质。例如,如果抗体用于在溶液中结合抗原,可能需要测试溶液结合。可获得各种不同的技术以测试抗体和抗原之间的相互作用,以鉴定特别需要的抗体。这样的技术包括ELISA、表面等离子体共振结合测定法(例如,Biacore结合测定法,Biacore AB,Uppsala,Sweden)、夹心测定法

(例如, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland 的顺磁珠系统)、蛋白质印迹、免疫沉淀测定法和免疫组织化学。

[0417] 在某些实施方案中, 考虑了本文提供的抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体。例如, 可能需要改进抗体和/或结合多肽的结合亲和力和/或其它生物学性质。抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体可通过引入合适的修饰至编码抗体和/或结合多肽的核苷酸序列或通过肽合成来制备。这样的修饰包括例如, 抗体和/或结合多肽的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或置换。可进行缺失、插入和置换的任何组合以实现最终的构建体, 只要最终的构建体具有需要的特征, 例如, 靶标结合 (GDF11 和/或活化素B结合)。

[0418] 可在HVR中进行改变(例如, 置换), 例如以改进抗体亲和力。这样的改变可在HVR“热点”, 即由在体细胞成熟过程中经过高频率突变的密码子编码的残基[参见例如, Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)]和/或SDRs (a-CDRs) 中进行, 其中测试得到的变体 VH或VL的结合亲和力。本领域已描述通过构建二级文库和从中再选择的亲和力成熟[参见例如, Hoogenboom等, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, 0' Brien等编辑, Human Press, Totowa, N.J., (2001)。在亲和力成熟的一些实施方案中, 通过各种方法的任一种将多样性引入经选择用于成熟的可变基因中(例如, 易错PCR、链改组或寡核苷酸-定点诱变)。然后产生二级文库。然后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一方法包括HVR-定向方法, 其中数个HVR残基(例如, 一次4-6残基)被随机化。参与抗原结合的 HVR残基可被特别鉴定, 例如, 使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别是, 经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0419] 在某些实施方案中, 置换、插入或缺失可在一个或多个HVR内发生, 只要这样的改变基本上不减少抗体结合抗原的能力。例如, 基本上不减少结合亲和力的保守改变(例如, 本文提供的保守置换)可在 HVR中进行。这样的改变可在HVR“热点”或SDR外。在上述提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中, 每个HVR是未改变的, 或包含不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0420] 用于鉴定抗体和/或结合多肽的可靶向诱变的残基或区域的方法被称为“丙氨酸扫描诱变”, 描述于Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085。在该方法中, 残基或一组靶残基(例如, 带电荷残基, 例如Asp、Arg、His、Lys和Glu)被鉴定和被中性或带负电荷的氨基酸(例如, 丙氨酸或多聚丙氨酸)置换, 以确定抗体-抗原相互作用是否受到影响。进一步的置换可在证实对初始置换功能敏感性的氨基酸位置引入。或者, 或另外, 抗原-抗体复合物的晶体结构经测定以鉴定抗体和抗原之间的接触点。这样的接触残基和邻近残基可被靶向或消除, 作为置换候选者。变体可经筛选以确定它们是否包含需要的性质。

[0421] 氨基酸序列插入包括长度范围为1个残基至包含一百或更多个残基的多肽的氨基-和/或羧基-末端融合物, 以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-或C-末端融合至酶(例如, 对于ADEPT)或增加抗体的血清半寿期的多肽。

[0422] 在某些实施方案中, 本文提供的抗体和/或结合多肽可进一步修饰以包含本领域已知的和容易获得的另外的非蛋白性部分。适合于衍生抗体和/或结合多肽的部分包括但不限于水可溶性聚合物。水可溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧基甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚-1,3-二

氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇同聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇和其混合物。聚乙二醇丙醛由于其水稳定性可具有制造益处。聚合物可具有任何分子量和可以是分支的或未分支的。连接至抗体和/或结合多肽的聚合物的数量可改变,和如果连接超过一个聚合物,它们可以是相同的或不同的分子。一般而言,用于衍生的聚合物的数量和/或类型可根据以下考虑来确定,包括但不限于待改进的抗体和/或结合多肽的特定性质或功能,抗体衍生物和/或结合多肽衍生物是否将在限定的条件下用于疗法。

[0423] D. 小分子拮抗剂

[0424] 在其它方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂是小分子(ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂)或小分子拮抗剂的组合。ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可抑制,例如,一种或多种ALK4:ActRIIB-结合配体、I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIB)和/或共受体。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制由一种或多种ALK4:ActRIIB-结合配体介导的信号传导,例如在基于细胞的测定法例如本文所述的那些测定法中测定的。如本文所述的,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂可单独或与一种或多种支持性疗法或活性剂组合用于治疗有需要的患者(例如,具有骨相关疾病或病况、肌肉相关疾病或病况或与过量或不需要的脂肪有关的疾病或病况的受试者)。

[0425] 在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制GDF11。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制GDF8。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制活化素(活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、活化素BC、活化素AE和/或活化素BE)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制GDF11、GDF8和活化素。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制ALK4。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制ActRIIB。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制BMP6。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制GDF3。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合至少抑制BMP10。在一些实施方案中,本文公开的ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合不抑制或基本上不抑制BMP9。

[0426] ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂可以是直接或间接抑制剂。例如,间接小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可抑制至少一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、GDF11、BMP10、BMP6和GDF3]、I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIB)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smads)的表达(例如,转录、翻译、细胞分泌或其组合)。或者,直接小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可直接结合和抑制例如,一种或多种结合ALK4:ActRIIB异多聚体的TGF- β 超家族配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF11、GDF8、BMP10、BMP6和GDF3]、I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIB)、共受体(例如,Cripto或Cryptic)和/或下游信号传导组分(例如,Smads)。一种或多种间接和一种或多种直接ALK4:ActRIIB小分子拮抗剂的组合可根据本文公开的方法使用。

[0427] 本公开内容的结合小分子拮抗剂可经鉴定和使用已知的方法化学合成(参见例如,PCT公开号W0 00/00823和W0 00/39585)。一般而言,本公开内容的小分子拮抗剂通常小于约2000道尔顿大小,或者小于约1500、750、500、250或200道尔顿大小,其中这样的有机小分子能够结合、优选地特异性结合本文所述的多肽。这些小分子拮抗剂可使用众所周知的技术鉴定而无需过度实验。在此方面,注意用于筛选有机小分子文库的能够结合多肽靶标的分子的技术是本领域众所周知的(参见例如,国际专利公开号W000/00823和W000/39585)。

[0428] 本公开内容的结合有机小分子可以是例如,醛、酮、肟、腙、缩氨基脲、碳二酰肼、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的脒、酰脒、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、脲、氨基甲酸酯、碳酸酯、缩酮、硫代缩酮、缩醛、硫代缩醛、芳基卤化物、芳基磺酸酯、烷基卤化物、烷基磺酸酯、芳香族化合物、杂环化合物、苯胺、烯、炔、二醇、氨基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺酰胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、磺酰氯、重氮基化合物和酰基氯。

[0429] E. 多核苷酸拮抗剂

[0430] 在其它方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂是多核苷酸(ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂)或多核苷酸的组合。ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合可抑制例如,一种或多种ALK4:ActRIIB-结合配体[例如,活化素(例如,活化素A、活化素B和活化素AB)、GDF8、GDF11、BMP10、BMP6和GDF3]、I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIB)、共受体和/或下游信号传导组分(例如,Smads)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制由一种或多种ALK4:ActRIIB-结合配体介导的信号传导,例如,如在基于细胞的测定法例如本文所述的那些测定法中测定的。如本文所述的,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂可单独或与一种或多种支持性疗法或活性剂组合使用以治疗有需要的患者(例如,具有骨相关疾病或病况、肌肉相关疾病或病况或与过量或不需要的脂肪有关的疾病或病况的受试者)。

[0431] 在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制GDF11。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制GDF8。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制活化素(活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、活化素AE、活化素BC和/或活化素BE)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制GDF11、GDF8和活化素。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制ALK4。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制ActRIIB。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制BMP6。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制GDF3。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合至少抑制BMP10。在一些实施方案中,本文公开的ALK4:ActRIIB多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合不抑制或不显著抑制BMP9。

[0432] 在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸拮抗剂可以是反义核酸、RNAi分子[例如,小干扰RNA(siRNA)、小-发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)]、适体和/或核酶。人GDF11、活化素B、GDF8、活化素A、BMP6、GDF3、ALK4、ActRIIB和BMP10的核酸和氨基酸序列是本领域已

知的。此外,产生多核苷酸拮抗剂的许多不同的方法是本领域众所周知的。因此,根据本公开内容使用的多核苷酸拮抗剂可由本领域技术人员基于本领域的知识和本文提供的教导常规制备。

[0433] 反义技术可通过反义DNA或RNA或通过三股螺旋形成,用于控制基因表达。反义技术论述于例如,Okano (1991) *J. Neurochem.* 56:560; *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)。三股螺旋形成论述于例如,Cooney等 (1988) *Science* 241:456;和Dervan等, (1991) *Science* 251:1300。该方法基于多核苷酸与互补DNA或RNA的结合。在一些实施方案中,反义核酸包含单链的RNA或DNA序列,其与本文公开的基因的RNA转录物的至少一部分互补。然而,绝对互补性尽管是优选的,但不是必需的。

[0434] 本文提及的“与RNA的至少一部分互补的”序列是指具有足够的互补性能够与RNA杂交,形成稳定的双链体的序列;在本文公开的基因的双链反义核酸的情况下,可因此测试双链体DNA的单链,或可测定三链体形成。杂交能力取决于互补性的程度和反义核酸的长度。通常,杂交核酸越长,其可包含越多的与RNA的碱基错配,和仍形成稳定的双链体(或根据情况,三链体)。本领域技术人员可通过使用确定杂交复合物的解链温度的标准程序来确定错配的耐受程度。

[0435] 与信使的5'端、例如直至和包括AUG起始密码子的5'-非翻译序列互补的多核苷酸应在抑制翻译中最有效地起作用。然而,与mRNA的3'-非翻译序列互补的序列已表明也有效抑制mRNA的翻译[参见例如,Wagner, 艮, (1994) *Nature* 372:333-335]。因此,与本公开内容的基因的5'-或3'-非翻译、非编码区互补的寡核苷酸可用于反义方法以抑制内源mRNA的翻译。与mRNA的5'-非翻译区互补的多核苷酸应包括AUG起始密码子的组分。与mRNA编码区互补的反义多核苷酸是较不有效的翻译抑制剂,但能够根据本公开内容的方法使用。无论设计为与本公开内容的mRNA的5'-、3'-或编码区杂交,反义核酸应为至少6个核苷酸长度和优选地范围为6-约50个核苷酸长度的寡核苷酸。在特别的方面,寡核苷酸为至少10个核苷酸、至少17个核苷酸、至少25个核苷酸或至少50个核苷酸。

[0436] 在一个实施方案中,本公开内容的反义核酸通过自异源序列转录在细胞内产生。例如,载体或其部分经转录,产生本公开内容的基因的反义核酸(RNA)。这样的载体包含编码需要的反义核酸的序列。这样的载体可保持为附加体或成为染色体整合的,只要它可被转录以产生需要的反义RNA。这样的载体可通过本领域标准的重组DNA技术方法构建。载体可以是质粒、病毒或本领域已知的其它载体,用于在脊椎动物细胞中复制和表达。编码本公开内容的需要的基因或其片段的序列的表达可通过本领域已知的用于脊椎动物、优选地人细胞的任何启动子进行。这样的启动子可以是诱导型或组成型的。这样的启动子包括但不限于SV40早期启动子区[参见例如,Benoist和Chambon (1981) *Nature* 290:304-310]、在劳斯肉瘤病毒的3'长-末端重复区中包含的启动子[参见例如,Yamamoto等 (1980) *Cell* 22:787-797]、疱疹胸腺嘧啶启动子[参见例如,Wagner等 (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445]和金属硫蛋白基因的调节序列[参见例如,Brinster,等 (1982) *Nature* 296:39-42]。

[0437] 在一些实施方案中,多核苷酸拮抗剂是干扰RNA (RNAi) 分子,其靶向以下一种或多种的表达:GDF11、活化素B、GDF8、活化素A、BMP6、GDF3、BMP10、ALK4和ActRIIB。RNAi是指干

扰靶标 mRNA 的表达的 RNA 的表达。特别地, RNAi 通过与特定的 mRNA 通过 siRNA (小干扰 RNA) 相互作用来沉默靶标基因。ds RNA 复合物然后被细胞靶向降解。siRNA 分子是 10-50 个核苷酸长度的双链的 RNA 双链体, 其干扰足够互补的靶基因 (例如, 与该基因具有至少 80% 同一性) 的表达。在一些实施方案中, siRNA 分子包含与靶基因的核苷酸序列具有至少 85、90、95、96、97、98、99 或 100% 同一性的核苷酸序列。

[0438] 另外的 RNAi 分子包括短发夹 RNA (shRNA); 以及短干扰发夹和微 RNA (miRNA)。shRNA 分子包含通过环连接的来自靶基因的有义和反义序列。shRNA 从细胞核转运至细胞质并且其与 mRNA 一起降解。对于 RNAi, Pol III 或 U6 启动子可用于表达 RNA。Paddison 等 [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002] 已经使用折叠成发夹的小的 RNA 分子作为实现 RNAi 的工具。因此, 这样的短发夹 RNA (shRNA) 分子也可有利地用于本文所述的方法。功能 shRNA 的茎和环的长度不同; 茎长度范围可大概为约 25--约 30nt, 和环大小范围可为 4-约 25nt 而不影响沉默活性。尽管不希望受任何特定理论的束缚, 认为这些 shRNA 类似于 DICER RNase 的双链 RNA (dsRNA) 产物, 并且在任何情况下具有相同的抑制特定基因表达的能力。shRNA 可从慢病毒载体表达。miRNA 是约 10-70 个核苷酸长度的单链 RNA, 其初始转录为特征为“茎-环”结构的前-miRNA, 后者在通过 RISC 进一步加工后, 随后被加工成成熟 miRNA。

[0439] 介导 RNAi 的分子, 包括但不限于 siRNA, 可通过化学合成 (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002)、dsRNA 水解 (Yang 等, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), 通过用 T7RNA 聚合酶体外转录 (Donzeet 等, Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu 等, Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002) 和使用核酸酶例如大肠杆菌 RNase III 通过双链 RNA 水解 (Yang 等, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002) 体外产生。

[0440] 根据另一方面, 本公开内容提供了多核苷酸拮抗剂, 其包括但不限于诱饵 DNA、双链 DNA、单链 DNA、复合 DNA、包封 DNA、病毒 DNA、质粒 DNA、裸 RNA、包封 RNA、病毒 RNA、双链 RNA、能够产生 RNA 干扰的分子或其组合。

[0441] 在一些实施方案中, 本公开内容的多核苷酸拮抗剂是适体。适体是核酸分子, 包括双链 DNA 和单链 RNA 分子, 其结合和形成特异性结合靶分子的三级结构。适体的产生和治疗用途是本领域充分确立的 (参见例如, 美国专利号 5,475,096)。关于适体的另外信息可见于美国专利申请公开号 20060148748。核酸适体使用本领域已知的方法选择, 例如通过 Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) 方法。SELEX 是具有与靶分子高度特异性结合的核酸分子的体外进化的方法, 如描述于例如, 美国专利号 5,475,096; 5,580,737; 5,567,588; 5,707,796; 5,763,177; 6,011,577 和 6,699,843。鉴定适体的另一筛选方法描述于美国专利号 5,270,163。SELEX 方法基于核酸形成各种二维和三维结构的能力, 以及核苷酸单体内作为配体的可用化学多功能性 (与基本上任何化学化合物形成特异性结合对, 无论是单体或聚合物, 包括其它核酸分子和多肽)。任何大小的分子或组分可用作靶标。SELEX 方法包括从候选寡核苷酸的混合物选择, 和结合、分隔和扩增的逐步重复, 使用相同的通用选择方案, 以实现需要的结合亲和力和选择性。从可包含随机化序列的区段的核酸的混合物开始, SELEX 方法包括以下步骤: 使混合物与靶标在有利于结合的条件下接触; 分隔未结合的核酸与已经特异性结合至靶分子的那些核酸; 离解核酸-靶标复合物; 扩增从核酸-靶标复合物离解的核酸以得到富含配体的核酸混合物。结合、分隔、离解和扩增的步骤按需要重复许多循环, 以得到以高亲和力和特异性结合靶标分子的核酸

配体。

[0442] 通常,这样的结合分子单独给予动物[参见例如,0'Connor(1991) J.Neurochem.56:560],但这样的结合分子也可自宿主细胞摄入的多核苷酸体内表达,和体内表达[参见例如,Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press,Boca Raton,Fla. (1988)]。

[0443] F. 卵泡抑素和FLRG拮抗剂

[0444] 已知卵泡抑素和FLRG族蛋白的成员拮抗通过ALK4:ActRIIB途径发信号的配体。因此,在其它方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂是卵泡抑素或FLRG多肽,其可单独或与本文公开的一种或多种另外的支持性疗法和/或活性剂组合使用,以实现需要的效果(例如,治疗具有肾疾病和/或代谢病症的患者)。

[0445] 术语“卵泡抑素多肽”包括包含卵泡抑素的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和拟肽形式)的多肽,和进一步包括卵泡抑素的任何功能单体或多聚体。在某些优选的实施方案中,本公开内容的卵泡抑素多肽结合和/或抑制活化素和/或GDF8活性。卵泡抑素多肽的保留活化素结合性质的变体可根据之前的涉及卵泡抑素和活化素相互作用的研究鉴定。例如, W02008/030367公开了特定的卵泡抑素结构域(“FSD”),其表明对于活化素结合是重要的。如在下文SEQ ID NOs:90-94中显示的,卵泡抑素 N-末端结构域(“FSND”SEQ ID NO:92)、FSD2(SEQ ID NO:94)和较少程度上FSD1(SEQ ID NO:93)代表了卵泡抑素内对于活化素结合是重要的实例性结构域。此外,用于制备和测试多肽文库的方法在上文的ActRII多肽的情况下进行了描述,和这样的方法还涉及制备和测试卵泡抑素变体。卵泡抑素多肽包括源自任何已知卵泡抑素的序列的多肽,其具有与卵泡抑素多肽的序列具有至少约80%同一性和任选地至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同一性的序列。卵泡抑素多肽的实例包括成熟的卵泡抑素多肽或人卵泡抑素前体多肽 (SEQ ID NO:90)的较短的同种型或其它变体,如描述于例如 W02005/025601。

[0446] 人卵泡抑素前体多肽同种型FST344如下:

[0447] 1 MVRARHQPGG LLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL

[0448] 51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC

[0449] 101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC

[0450] 151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRICPEPA

[0451] 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC

[0452] 251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA

[0453] 301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEDE DQDYSFPISSILEW

[0454] (SEQ ID NO:90;NCBI参考号NP_037541.1)

[0455] 信号肽用下划线表示;上文的下划线还表示最后27个残基,其代表了区分该卵泡抑素同种型与下文所示的较短的卵泡抑素同种型 FST317的C-末端延伸。

[0456] 人卵泡抑素前体多肽同种型FST317如下:

[0457] 1 MVRARHQPGGLLLLLLLLCQFMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL

[0458] 51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC

[0459] 101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC

- [0460] 151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFPCGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA
- [0461] 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
- [0462] 251 TGGKKCLWDF KVGRGRC SLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
- [0463] 301 ACSSGVLLLEV KHSGSCN (SEQ ID NO:91;NCBI参考号 NP_006341.1)
- [0464] 信号肽用下划线表示。
- [0465] 卵泡抑素N-末端结构域(FSND)序列如下:
- [0466] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO:92; FSND)
- [0467] FSD1和FSD2序列如下:
- [0468] ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 93;FSD1)
- [0469] KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVT (SEQ ID NO:94;FSD2)
- [0470] 在其它方面,ALK4:ActRIIB拮抗剂是卵泡抑素-样相关基因 (FLRG),亦称为卵泡抑素-相关蛋白3(FSTL3)。术语“FLRG多肽”包括包含FLRG的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和拟肽形式)的多肽。在某些实施方案中,本公开内容的FLRG多肽结合和/或抑制活化素活性、特别是活化素A。FLRG多肽的保留活化素结合性质的变体可使用测定FLRG和活化素相互作用的常规方法鉴定(参见例如,US 6,537,966)。此外,用于制备和测试多肽文库的方法在上文的ActRII和ALK4多肽的背景下进行描述,和这样的方法还涉及制备和测试FLRG的变体。FLRG多肽包括源自任何已知FLRG的序列的多肽,其具有与FLRG多肽的序列具有至少约80%同一性和任选地至少85%、90%、95%、97%、99%或更大同一性的序列。
- [0471] 人FLRG前体(卵泡抑素-相关蛋白3前体)多肽如下:
- [0472] 1 MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGFVSSMSG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL
- [0473] 51 VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD
- [0474] 101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECELRA
- [0475] 151 ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC
- [0476] 201 PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP
- [0477] 251 PGGESAEEEE NFV (SEQ ID NO:95;NCBI参考号 NP_005851.1)
- [0478] 信号肽用下划线表示。
- [0479] 在某些实施方案中,卵泡抑素多肽和FLRG多肽的功能变体或修饰形式包括具有至少一部分的卵泡抑素多肽或FLRG多肽和一种或多种融合结构域、例如促进多肽的分离、检测、稳定或多聚化的结构域的融合蛋白。合适的融合结构域在上文参照ActRII多肽详细论述。在一些实施方案中,本公开内容的拮抗剂是包含融合至Fc结构域的卵泡抑素多肽的活化素-结合部分的融合蛋白。在另一实施方案中,本公开内容的拮抗剂是包含融合至Fc结构域的FLRG多肽的活化素结合部分的融合蛋白。
- [0480] 5. 筛选测定法
- [0481] 在某些方面,本公开内容涉及ALK4:ActRIIB异多聚体鉴定作为 TGFβ超家族受体的激动剂或拮抗剂的化合物(试剂)的用途。通过该筛选鉴定的化合物可经测试以评价其调节组织例如骨、软骨、肌肉、脂肪和/或神经元的能力,评价其体内或体外调节组织生长的能力。这些化合物可例如,在动物模型中测试。

[0482] 存在许多方法来筛选通过靶向TGF β 超家族配体信号传导(例如, SMAD 2/3和/或SMAD 1/5/8信号传导)调节组织生长的治疗剂。在某些实施方案中,可进行化合物的高通量筛选以鉴定干扰TGF β 超家族受体-介导的对选择的细胞系的作用的试剂。在某些实施方案中,进行所述测定法以筛选和鉴定特异性抑制或减少ALK4:ActRIIB异多聚体与其结合配偶体、例如TGF β 超家族配体(例如, BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、活化素A、活化素B、活化素AB、活化素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty)结合的化合物。或者,所述测定法可用于鉴定增强ALK4:ActRIIB异多聚体与其结合配偶体例如TGF β 超家族配体结合的化合物。在进一步的实施方案中,化合物可通过其与ALK4:ActRIIB异多聚体相互作用的能力来鉴定。

[0483] 各种测定法形式符合要求,并且根据本公开内容,本文未明确描述的那些将仍然被本领域普通技术人员所理解。如本文所述的,本发明的试验化合物(试剂)可通过任何组合化学方法产生。或者,本发明的化合物可以是体内或体外合成的天然存在的生物分子。待测试作为组织生长的调节剂的能力的化合物(试剂)可例如,通过细菌、酵母、植物或其它生物体产生(例如,天然产物),通过化学产生(例如,小分子,包括拟肽)或通过重组产生。本发明考虑的试验化合物包括无肽基有机分子、肽、多肽、拟肽、糖、激素和核酸分子。在某些实施方案中,试验试剂是具有小于约2,000道尔顿的分子量的小的有机分子。

[0484] 本公开内容的试验化合物可作为单一的离散实体提供,或在较大复杂性的文库(例如通过组合化学制备)中提供。这些文库可包含,例如,醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚和其它类型的有机化合物。试验化合物至试验系统的呈递可以为分离的形式或作为化合物的混合物,尤其是在初始筛选步骤中。任选地,化合物可任选地用其它化合物衍生,和具有促进化合物的分离的衍生基团。衍生基团的非限制性实例包括生物素、荧光素、洋地黄毒苷、绿色荧光蛋白、同位素、多组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、光可激活交联剂或其任何组合。

[0485] 在测试化合物的文库和天然提取物的许多药物-筛选程序中,需要高通量测定法以最大化在给定的时间内调查的化合物的数量。在无细胞系统中进行的测定法(例如可用纯化或半纯化的蛋白得到),通常优选作为“初级”筛选,因为它们可经产生以允许由试验化合物介导的分子靶标改变的快速发展和相对容易检测。此外,试验化合物的细胞毒性或生物利用率的影响在体外系统中一般可忽略,该测定法而是主要关注药物对分子靶标的影响,如可以在ALK4:ActRIIB异多聚体和其结合配偶体(例如, BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty)之间的结合亲和力的改变所证明的。

[0486] 仅为说明,在本公开内容的实例性筛选测定法中,对于测定法的目的在合适时,目的化合物与通常能够结合TGF- β 超家族配体的分离和纯化的ALK4:ActRIIB异多聚体接触。然后向化合物和ALK4:ActRIIB异多聚体的混合物中加入包含合适的TGF- β 超家族配体(例

如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、活化素A、活化素B、活化素C、活化素E、活化素AB、活化素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS和Lefty)的组合物。异多聚体-超家族配体复合物的检测和定量提供了用于测定化合物抑制(或加强)ALK4:ActRIIB异多聚体和其结合蛋白之间的复合物形成的功效的手段。化合物的功效可通过从使用各种浓度的试验化合物获得的数据产生剂量-反应曲线进行评价。此外,还可进行对照测定以提供用于比较的基线。例如,在对照测定中,将分离和纯化的TGF- β 超家族配体加入包含ALK4:ActRIIB异多聚体的组合物中,和在缺少试验化合物的情况下量化异多聚体-配体复合物的形成。将理解,一般而言,反应物可混合的顺序可以改变,和可以同时混合。此外,代替纯化的蛋白,细胞提取物和裂解物可用于提供合适的无细胞测定系统。

[0487] ALK4:ActRIIB异多聚体与另一蛋白的结合可通过各种技术检测。例如,复合物形成的调节可使用例如,可检测标记的蛋白例如放射性标记的(例如, ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H)、荧光标记的(例如,FITC)或酶标记的ALK4:ActRIIB异多聚体和/或其结合蛋白,通过免疫测定法或通过色谱检测来量化。

[0488] 在某些实施方案中,本公开内容考虑了荧光极化测定法和荧光共振能量转移(FRET)测定法在直接或间接测量ALK4:ActRIIB异多聚体和其结合蛋白之间相互作用的程度中的用途。此外,其它检测模式,例如基于光波导的那些(PCT公布WO 96/26432和美国专利号 5,677,196)、表面等离子体共振(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器,与本公开内容的许多实施方案相容。

[0489] 此外,本公开内容考虑了相互作用陷阱测定法,亦称为“双杂交测定法”用于鉴定破坏或增强ALK4:ActRIIB异多聚体和其结合配偶体之间相互作用的试剂的用途。参见例如,美国专利号5,283,317;Zervos 等(1993) Cell 72:223-232;Madura等(1993) J Biol Chem 268:12046-12054;Bartel等(1993) Biotechniques 14:920-924;和Iwabuchi 等(1993) Oncogene 8:1693-1696)。在特定的实施方案中,本公开内容考虑了反转双杂交系统鉴定离解ALK4:ActRIIB异多聚体和其结合蛋白之间相互作用的化合物(例如,小分子或肽)的用途[Vidal和Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29;Vidal和Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81;和美国专利号5,525,490;5,955,280;和5,965,368]。

[0490] 在某些实施方案中,本发明的化合物通过其与本公开内容的 ALK4:ActRIIB异多聚体相互作用的能力来鉴定。在化合物和 ALK4:ActRIIB异多聚体之间的相互作用可以是共价或非共价的。例如,这样的相互作用可在蛋白水平上使用体外生物化学方法,包括光交联、放射性标记的配体结合和亲和色谱鉴定[Jakoby WB等(1974) Methods in Enzymology 46:1]。在某些情况下,化合物可在基于机制的测定法中筛选,例如检测结合ALK4:ActRIIB异多聚体的化合物的测定法。这可包括固相或液相结合事件。或者,编码ALK4:ActRIIB异多聚体的基因可用报告系统(例如, β -半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白)转染至细胞和针对文库优选地通过高通量筛选或以文库的各个成员进行筛选。可使用其它基于机制的结合测定法;例如,检测自由能变化的结合测定法。结合测定法可用固定至孔、珠或芯片的,或通过固定的抗体捕获的,或通过毛细管电泳解析的靶标进行。结合的化合物可通常使用比

色终点或荧光或表面等离子体共振检测。

[0491] 6. 实例性治疗用途

[0492] 在某些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂或 ALK4:ActRIIB拮抗剂的组合可用于治疗或预防与ALK4:ActRIIB-结合配体的异常活性有关的疾病或病况。这些疾病、病症或病况在本文通常称为“ALK4:ActRIIB-相关病况”或“ALK4:ActRIIB-相关病症”。在某些实施方案中,本公开内容提供了通过给予有需要的个体治疗有效量的本文所述的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体例如ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合,治疗或预防个体的ALK4:ActRIIB-相关病况的方法。术语“受试者”、“个体”或“患者”在说明书全文中可互换。本公开内容的任何ALK4:ActRIIB拮抗剂可潜在地单独或组合使用,用于本文公开的治疗用途。这些方法的目的特别在于治疗性和预防性治疗哺乳动物,包括例如,啮齿动物、灵长类动物和人。

[0493] 如本文所用的,“预防”病症或病况的治疗剂是指在统计学样品中,相对于未治疗的对照样品在治疗的样品中减少病症或病况的发生,或相对于未治疗的对照样品延迟病症或病况的一种或多种症状的发生或减少其严重性的化合物。如本文所用的术语“治疗”包括一旦已经确立,则改善或消除病况。在任一情况下,预防或治疗可在由医生或其它健康护理提供者提供的诊断和给予治疗剂的预期结果中辨别。

[0494] 一般而言,本公开内容中描述的疾病或病况的治疗或预防通过给予“有效量”的本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂或这样的拮抗剂的组合来实现。试剂的有效量是指在需要的剂量和时间下有效实现需要的治疗或预防结果的量。本公开内容的试剂的“治疗有效量”可根据因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,和试剂在个体中引发需要的反应的能力而改变。“预防有效量”是指在需要的剂量和时间下有效实现需要的预防结果的量。

[0495] 天然存在的ALK4和ActRIIB受体-配体复合物在组织生长以及早期发育过程,例如各种结构的正确形成中或在一种或多种发育后能力,包括性发育、脑垂体激素产生以及骨和软骨产生中起重要作用。因此,ALK4:ActRIIB-相关病况包括但不限于异常组织生长和发育缺陷。此外,ALK4:ActRIIB-相关病况包括但不限于,细胞生长和分化的病症,例如炎症、变态反应、自身免疫疾病和肿瘤。

[0496] 例如,ALK4:ActRIIB-相关病况包括神经肌肉病症(例如,肌营养不良和肌肉萎缩)、充血性阻塞性肺病(和与COPD有关的肌肉消瘦)、肌肉消瘦综合征、肌少症、恶病质、脂肪组织病症(例如,肥胖)、2型糖尿病(NIDDM、成年型糖尿病)和骨退化疾病(例如,骨质疏松症)。其它实例性ALK4:ActRIIB-相关病况包括肌肉退化和神经肌肉病症、组织修复(例如,伤口愈合)、神经变性疾病(例如,肌萎缩侧索硬化)和免疫学病症(例如,与淋巴细胞的异常增殖或功能有关的病症)。

[0497] 在某些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用作肌营养不良的治疗的一部分。术语“肌营养不良”是指一组退化肌肉疾病,特征为逐渐虚弱,和骨骼肌肉,有时心脏和呼吸肌肉的退化。肌营养不良是遗传病症,特征为渐进性肌肉消瘦和虚弱,其以肌肉的微观变化开始。因为肌肉随时间退化,人的肌肉力量下降。可用包括本发明的TGF- β 超家族异多聚体复合物的方案治疗的实例性肌营养不良包括:杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)、埃-德二氏肌营养不良(EDMD)、角膜缘带肌营养不良(LGMD)、面肩肱型肌营养不良(FSH 或FSHD)(亦称为

Landouzy-Dejerine)、强直性肌营养不良 (MMD; 亦称为斯太纳特氏病)、眼咽肌营养不良 (OPMD)、远端肌营养不良 (DD)、先天性肌营养不良 (CMD)。

[0498] 杜氏肌营养不良 (DMD) 在19世纪60年代首次由法国神经学家 Guillaume Benjamin Amand Duchenne描述。贝克肌营养不良 (BMD) 根据德国医生Peter Emil Becker命名, 其在20世纪50年代首次描述了这种DMD变体。DMD是在男性中最频繁遗传的疾病之一, 影响 1/3,500的男孩。当位于X染色体的短臂上的肌养蛋白基因缺陷时, DMD发生。因为男性仅携带一个拷贝的X染色体, 因此他们仅具有一个拷贝的肌养蛋白基因。没有肌养蛋白, 在收缩和舒张循环期间肌肉容易受到损害。尽管在疾病早期肌肉通过再生得到补偿, 但晚期肌肉祖细胞不能跟上进行中的损害和健康肌肉被无功能的纤维脂肪组织代替。

[0499] BMD由肌养蛋白基因的不同突变产生。BMD患者具有一些肌养蛋白, 但其数量不足或质量差。一些肌养蛋白的存在保护BMD患者的肌肉免于与DMD患者一样严重或快速地退化。

[0500] 动物中的研究表明, 抑制GDF8信号传导途径可有效地治疗DMD 和BMD患者的各种方面的疾病 (Bogdanovich等, 2002, Nature 420:418-421; Pistilli等, 2011, Am J Pathol 178:1287-1297)。因此, 本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂可用作GDF8抑制剂 (拮抗剂), 和构成在DMD和BMD患者体内通过GDF8和/或相关的TGF β 超家族配体阻断信号传导的可选方式。

[0501] 类似地, 本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂可提供在需要肌肉生长的其它疾病情况下增加肌肉质量的有效方式。例如, 肌萎缩侧索硬化 (ALS), 亦称为Lou Gehrig病或运动神经元疾病, 是一种慢性的渐进性和难治的CNS病症, 其攻击作为起始骨骼肌肉收缩所需的中枢神经系统的组分的运动神经元。在ALS中, 运动神经元退化和最终死亡, 和虽然人脑正常保持完整功能和警觉, 但肌肉收缩的起始在脊椎水平上被阻断。发生ALS的个体通常在40-70岁, 和退化的第一运动神经元是神经支配臂或腿的那些。ALS患者可具有行走障碍, 可掉东西, 跌倒, 口齿不清, 和不受控制地笑或哭。随着疾病进展, 四肢的肌肉开始从不使用到萎缩。肌肉虚弱变得衰弱, 和患者最终需要轮椅或限制于床上。大多数ALS患者在疾病发作后3-5年死于呼吸衰竭或呼吸机辅助样肺炎的并发症。

[0502] 通过ALK4:ActRIIB拮抗剂促进肌肉质量增加还可能使患有肌肉消瘦疾病的那些患者获益。Gonzalez-Cadavid等 (同上) 报道了GDF8 表达与人中的无脂肪体重负相关, 和GDF8基因的表达增加与AIDS 消瘦综合征的男性中体重减轻有关。通过抑制AIDS患者中的GDF8 功能, 如果没有完全消除的话, AIDS的至少某些症状可得到减轻, 因此显著改进AIDS患者的生活质量。

[0503] 因为GDF8功能丢失还伴随在没有减少营养物摄入的情况下脂肪减少 (Zimmers等, 同上; McPherron和Lee, 同上), 本发明的 ALK4:ActRIIB拮抗剂可进一步用作减慢或预防肥胖和2型糖尿病的发生的治疗剂。

[0504] 癌症食欲缺乏-恶病质综合征是癌症的最虚弱和威胁生命的方面。该综合征是许多类型的癌症的共同特征 (存在于大约80%的死亡癌症患者中), 并且不仅是生活质量差和对化学疗法反应差的原因, 而且是比具有相当的肿瘤但没有体重减轻的患者更短存活时间的原因。如果在6个月时间内大于5%的发病前体重的无意体重减轻发生, 则通常认为恶病质在癌症患者中。与食欲缺乏、脂肪和肌肉组织消瘦以及心理苦恼有关, 恶病质从癌症和宿

主之间的复杂相互作用产生。癌症恶病质影响细胞因子产生、脂质运动和蛋白水解-诱导因子的释放和中间代谢的改变。尽管食欲缺乏是常见的,但仅食物摄入降低不能够解释癌症患者中见到的身体组成的变化,和增加营养物摄入不能逆转消瘦综合征。目前,没有控制或逆转恶病质过程的治疗。因为发现在成年小鼠中GDF8的系统过量表达诱导显著的肌肉和脂肪损失,类似于人恶病质综合征中所见到的(Zimmers等,同上),因此本发明的 ALK4:ActRIIB拮抗剂可有利地用于预防、治疗或减轻其中需要肌肉生长的恶病质综合征的症状。上文所述的可用于预防、治疗或减轻肌肉损失的异聚复合物的实例是ALK4:ActRIIB异二聚体。

[0505] 在某些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如, ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于诱导骨和/或软骨形成,预防骨丢失,增加骨矿化,预防骨的去矿化和/或增加骨密度的方法。ALK4:ActRIIB拮抗剂可用于经诊断有亚临床低骨密度的患者,作为针对发生骨质疏松症的保护措施。

[0506] 在一些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如, ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可在人和其它动物中在骨折和软骨缺陷的治愈中具有医学功用。本发明的方法和组合物还可在关闭以及打开骨折复位术中以及在人工关节的改进固定中具有预防用途。由成骨剂诱导的从新骨形成可用于修复先天的、创伤-诱导的或由肿瘤切除引起的颅面缺损,和还可用于美容整形手术。此外,本发明的方法和组合物可用于治疗牙周疾病和其它牙齿修复过程。在某些情况下,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可提供吸引骨-形成细胞、刺激骨-形成细胞的生长或诱导骨-形成细胞的祖细胞分化的环境。本公开内容的 ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合还可用于治疗骨质疏松症。此外,ALK4:ActRIIB拮抗剂可用于修复软骨缺陷和预防/逆转骨关节炎。本文所述的可用于诱导骨形成、预防骨丢失、增加骨矿化、预防骨去矿化和/或增加骨密度的异聚复合物的实例是ALK4:ActRIIB异二聚体。

[0507] Rosen等(编辑)Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism,第7版.American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C.(通过引用并入本文)提供了可用 ALK4:ActRIIB拮抗剂或用这样的拮抗剂的组合治疗的骨病症的深入讨论。本文提供了部分列表。本发明的方法和组合物可应用于特征为或引起骨丢失的病况,例如骨质疏松症(包括继发性骨质疏松症)、甲状旁腺功能亢进、慢性肾病矿物骨病症、性激素丧失或消除(例如,雄激素和/或雌激素)、糖皮质激素治疗、类风湿性关节炎、重度烧伤、甲状旁腺功能亢进、高钙血症、低钙血症、低磷酸盐血症、骨软化症(包括肿瘤-诱导的骨软化症)、高磷酸盐血症、维生素D缺乏、甲状旁腺功能亢进(包括家族性甲状旁腺功能亢进)和假性甲状旁腺功能减退症、肿瘤转移至骨、因为肿瘤或化学疗法导致的骨丢失、骨和骨髓的肿瘤(例如,多发性骨髓瘤)、缺血性骨病症、牙周疾病和口腔骨丢失、库兴氏病、佩吉特病、甲状腺毒症、慢性腹泻体质或吸收不良、肾小管性酸中毒或神经性厌食。本发明的方法和组合物还可应用于特征为不能骨形成或愈合的病况,包括非连接骨折、以其它方式减慢愈合的骨折、胎儿和新生儿骨发育异常(例如,低钙血症、高钙血症、钙受体缺陷和维生素D缺乏)、骨坏死(包括颌的骨坏死)和骨发生不全。另外,合成代谢作用将导致这样的拮抗剂减少与骨损坏或侵蚀有关的骨疼痛。作为抗-再吸收作用的结果,

这样的拮抗剂可用于治疗异常骨形成的病症,例如成骨细胞肿瘤转移(例如,与原发性前列腺或乳腺癌有关)、成骨肉瘤、骨硬化症、进行性骨干发育异常、骨内膜骨质增生、骨斑症和肢骨纹状肥大。可治疗的其它病症包括纤维性结构不良和软骨发育异常。

[0508] 在另一具体的实施方案中,本公开内容提供了用于修复骨折和与软骨和/或骨缺陷有关的其它病况或牙周疾病的治疗方法和组合物。本发明进一步提供了用于伤口愈合和组织修复的治疗方法和组合物。伤口的类型包括但不限于,烧伤、切伤和溃疡。参见例如, PCT公布号 WO 84/01106。这样的组合物包含治疗有效量的至少一种本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂与药学上可接受的溶媒、载体或基质的混合物。

[0509] 在一些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如, ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可应用于引起骨丢失的病况,例如骨质疏松症、甲状旁腺功能亢进、库兴氏病、甲状腺毒症、慢性腹泻体质或吸收不良、肾小管性酸中毒或神经性厌食。通常应理解,作为女性,具有低体重和导致久坐生活方式是骨质疏松症的风险因素(骨矿物密度丢失,导致骨折风险)。然而,骨质疏松症也可自长期使用某些药物产生。自药物或另一医学病况产生的骨质疏松症被称为继发性骨质疏松症。在库兴氏病中,身体产生的过量皮质醇导致骨质疏松症和骨折。与继发性骨质疏松症有关的最常见的药物是皮质类固醇,一类像皮质醇(由肾上腺天然产生的激素)一样起作用的药物。尽管需要足够水平的甲状腺激素以发育骨骼,但过量的甲状腺激素可随时间减少骨量。包含铝的抗酸药当有肾问题的人、特别是经过透析的那些人以高剂量服用时,可导致骨丢失。可引起继发性骨质疏松症的其它药物包括用于预防癫痫的苯妥英(Dilantin)和巴比妥类;甲氨蝶呤(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS),一些类型的关节炎、癌症和免疫病症的药物;环孢霉素(Sandimmune, Neoral),用于治疗一些自身免疫疾病和在器官移植患者中抑制免疫系统的药物;黄体化激素-释放激素激动剂(Lupron, Zoladex),用于治疗前列腺癌和子宫内膜异位症;肝素(Calciparine, Liqueamin),一种抗凝血药物;和考来烯胺(Questran)和考来替泊(Colestid),用于治疗高胆固醇。自癌症疗法产生的骨丢失是广泛公认的,和被称为癌症疗法-诱导的骨丢失(CTIBL)。骨转移可在骨中产生洞,其可通过用ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如, ALK4:ActRIIB异二聚体)治疗来纠正。骨丢失也可由牙龈疾病引起,一种其中位于牙龈隐窝中的细菌产生毒素和有害的酶的慢性感染。

[0510] 在进一步的实施方案中,本公开内容提供了用于治疗与异常或不需要的骨生长有关的疾病或病症的方法和治疗剂。例如,具有先天性病症进行性骨化性纤维发育不良(FOP)的患者受累于在软组织中自发地或响应于组织创伤的进行性异位骨生长,对生活质量具有重大影响。另外,异常骨生长可在髋置换手术后发生,因此破坏手术结果。这是较常见的病理性骨生长的实例,和其中本发明的方法和组合物可在治疗上有用的情况。所述方法和组合物也可用于治疗其它形式的异常骨生长(例如,创伤、烧伤或脊椎损伤后骨的病理性生长)和用于治疗或预防在转移性前列腺癌或骨肉瘤中所见到的与异常骨生长有关的不需要的病况。

[0511] 在某些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如, ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于在癌症患者中促进骨形成。因为肿瘤-诱导的骨丢失、骨转移和治疗剂,具有某些肿瘤(例如,前列腺、乳腺、多发性骨髓瘤或引起甲状旁腺功能亢进的任何肿瘤)的患者对于骨丢失是高风险的。这样的患者可用TGF- β 超家族异多聚体

复合物或复合物的组合治疗,甚至在不存在骨丢失或骨转移的证据时。还可监测患者的骨丢失或骨转移的证据,和在指示物表明风险增加的情况下,可用ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗患者。一般而言,DEXA扫描用于评价骨密度的变化,而骨重塑的指示物可用于评价骨转移的可能性。可监测血清标记。骨特异性碱性磷酸酶(BSAP)是存在于成骨细胞中的酶。BSAP的血液水平在具有骨转移和导致骨重塑增加的其它病况的患者中增加。骨钙素和前胶原肽也与骨形成和骨转移有关。在由前列腺癌引起的骨转移的患者中,和在较小程度上在来自乳腺癌的骨转移中,已检测到BSAP增加。BMP7水平在已转移至骨的前列腺癌中很高,但在由于膀胱、皮肤、肝脏或肺癌导致的骨转移中不高。I型羧基-末端尾肽(ICTP)是一种在骨的再吸收期间形成的胶原中存在的交联点。因为骨经常打破和再形成,ICTP存在于整个身体内。然而,在骨转移的部位,水平显著高于正常骨的区域。ICTP以高水平存在于由于前列腺、肺和乳腺癌导致的骨转移中。另一胶原交联点,I型N-末端尾肽(NTx),在骨周转期间与ICTP一起产生。NTx的量在由许多不同类型的癌症引起的骨转移中增加,所述癌症包括肺、前列腺和乳腺癌。此外,NTx的水平随骨转移的进展而增加。因此,该标记可用于检测转移以及测量疾病的程度。再吸收的其它标记包括吡啶诺林和脱氧吡啶诺林。再吸收标记或骨转移标记的任何增加表明在患者中对用ALK4:ActRIIB拮抗剂的疗法的需要。

[0512] 在另一实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于慢性肾病矿物骨病症(CKD-MBD)的患者,其作为一种自肾病产生的相关骨骼、心血管和矿物-代谢病症的广泛综合征。CKD-MBD包括各种骨骼病理,通常称为肾性骨营养不良(ROD),其是用ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合治疗的优选实施方案。根据不同的病原性因子的相对贡献,ROD表现为多样的骨重塑病理模式(Hruska等,2008,Chronic kidney disease mineral bone disorder (CKD-MBD);Rosen等(编辑)Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism,7th ed.American Society for Bone and Mineral Research,Washington D.C.,pp 343-349)。范围的一端是具有尿毒症骨营养不良和低骨周转的ROD,特征为低数量的活性重塑部位,明显抑制的骨形成和低骨再吸收。另外一端是具有甲状旁腺功能亢进、高骨周转和纤维性骨炎的ROD。鉴于ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可发挥合成代谢和抗再吸收作用,这些试剂可用于在ROD病理范围内的患者。

[0513] 本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可与其它骨-活性药剂联合给予。联合给予可通过给予单一共制剂,通过同时给予,或通过以分开的时间给予来实现。如果与其它骨-活性剂一起给予,ALK4:ActRIIB拮抗剂可能是特别有利的。患者可获益于联合接受ALK4:ActRIIB拮抗剂复合物和服用钙补充剂、维生素D、合适的运动和/或,在一些情况下,其它药物。其它药物的实例包括,二膦酸盐(阿伦膦酸盐、伊班膦酸盐和利塞膦酸盐)、降钙素、雌激素、甲状旁腺激素和雷洛昔芬。二膦酸盐(阿伦膦酸盐、伊班膦酸盐和利塞膦酸盐)、降钙素、雌激素和雷洛昔芬影响骨重塑周期,和分类为抗-再吸收药物。骨重塑由两个不同阶段组成:骨再吸收和骨形成。抗-再吸收药物减慢或终止骨-重塑周期的骨-再吸收部分,但不减慢周期的骨-形成部分。结果是,新形成以比骨再吸收更大的速率持续,和骨密度可随时间而增加。特立帕肽,一种甲状旁腺激素形式,增加在骨重塑周期中骨形成的速率。阿伦膦酸盐经批准用于预防(5mg每天或35mg

每周一次) 和治疗 (10mg 每天或 70mg 每周一次) 绝经后骨质疏松症。阿伦膦酸盐减少骨丢失, 增加骨密度和减少脊柱、腕和髌骨折的风险。阿伦膦酸盐还经批准用于治疗在男性和女性中由于长期使用这些药物 (即, 泼尼松和可的松) 导致的糖皮质激素-诱导的骨质疏松症和用于治疗男性的骨质疏松症。阿伦膦酸盐加维生素 D 经批准用于治疗绝经后女性的骨质疏松症 (70mg 每周一次加维生素 D), 和用于治疗以改进骨质疏松症的男性的骨量。伊班膦酸盐经批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松症。作为每月一次丸剂 (150mg) 服用, 伊班膦酸盐应在每月的同一天服用。伊班膦酸盐减少骨丢失, 增加骨密度和减少脊柱骨折的风险。利塞膦酸盐经批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松症。每日 (5mg 剂量) 或每周 (35mg 剂量或 35mg 剂量与钙) 服用, 利塞膦酸盐减慢骨丢失, 增加骨密度和减少脊柱和非- 脊柱骨折的风险。利塞膦酸盐还经批准用于男性和女性使用以预防和 / 或治疗自长期使用这些药物 (即, 泼尼松或可的松) 产生的糖皮质激素- 诱导的骨质疏松症。降钙素是天然存在的激素, 其参与钙调节和骨代谢。在绝经期后超过 5 年的女性中, 降钙素减慢骨丢失, 增加脊椎骨密度, 和可减轻与骨折有关的疼痛。降钙素减少脊椎骨折的风险。降钙素可作为注射剂 (50-100IU 每日) 或鼻喷雾剂 (200IU 每日) 获得。

[0514] 患者还可获益于联合接受 ALK4:ActRIIB 拮抗剂或这样的拮抗剂的组合和另外的骨-活性药物。雌激素疗法 (ET) / 激素疗法 (HT) 经批准用于预防骨质疏松症。ET 已表明减少骨丢失, 增加在脊柱和髌二者中的骨密度和在绝经后女性中减少髌和脊椎骨折的风险。ET 最常见以递送大约 0.3mg 每日的低剂量或大约 0.625mg 每日的标准剂量的丸剂或皮肤贴剂的形式给予, 和甚至当 70 岁后开始也是有效的。当雌激素单独服用时, 其可增加女性发生子宫衬里的癌症 (子宫内膜癌症) 的风险。为了消除该风险, 健康护理提供者对于具有完整子宫的那些女性处方激素黄体酮与雌激素的组合 (激素置换疗法或 HT)。ET/HT 减轻绝经期症状和已表明对骨健康具有有益作用。副作用可包括阴道出血、乳房触痛、情绪障碍和胆囊疾病。雷洛昔芬, 60mg 每天, 经批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松症。已开发一类称为选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 的药物来提供雌激素的有益作用, 而没有其潜在的缺点。雷洛昔芬增加骨量和减少脊柱骨折的风险。尚未获得数据来证实雷洛昔芬可减少髌和其它非- 脊柱骨折的风险。特立帕肽, 一种甲状旁腺激素形式, 经批准用于在绝经后女性和具有骨折高风险的男性中治疗骨质疏松症。该药物刺激新骨形成和显著增加骨矿物密度。在绝经后女性中, 在脊柱、髌、足、肋骨和腕中注意到骨折复位。在男性中, 在脊柱中注意到骨折复位, 但没有足够的数据评价在其它部位的骨折复位。特立帕肽作为每日注射剂经自我- 给予至多 24 个月。

[0515] 在其它实施方案中, ALK4:ActRIIB 拮抗剂或这样的拮抗剂的组合可用于在动物中调节体脂肪含量和用于治疗或预防与其相关的病况, 和特别是, 与其相关的危及健康的病况。根据本发明, 调节 (控制) 体重可以指减少或增加体重, 减少或增加体重增加速率, 或增加或减少体重减轻速率, 和还包括有效维持或不显著改变体重 (例如, 对抗可以其它方式增加或减少体重的外部或内部影响)。本公开内容的一个实施方案涉及通过给予有需要的动物 (例如, 人) 本公开内容的 TGF- β 超家族异多聚体复合物或 TGF- β 超家族异多聚体复合物的组合来调节体重。

[0516] 在一些实施方案中, 本公开内容的 ALK4:ActRIIB 拮抗剂或这样的拮抗剂的组合可用于在动物中减少体重和/或减少体重增加, 和更特别是用于治疗或改善有肥胖风险或患

有肥胖的患者的肥胖。在另一具体的实施方案中,本发明涉及用于治疗不能增加或保持体重的动物(例如,具有消瘦综合征的动物)的方法和化合物。这样的方法有效增加体重和/或质量,或减少体重和/或质量损失,或改进与不需要的低(例如,不健康)体重和/或质量有关的病况,或由其引起的病况。此外,高胆固醇病症(例如,高胆固醇血症或血脂紊乱)可用本公开内容的 ALK4:ActRIIB拮抗剂或这样的拮抗剂的组合治疗。

[0517] 在其它实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB 异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于调节动物的体脂肪含量和用于治疗或预防与其相关的病况,特别是与其相关的损害健康的病况。根据本发明,调节(控制)体重可以指减少或增加体重、减少或增加体重增加速率或增加或减少体重减轻速率,和还包括有效维持或不显著改变体重(例如,针对否则可增加或减少体重的外部或内部影响)。本公开内容的一个实施方案涉及通过给予有需要的动物(例如,人) ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合调节体重。例如,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于治疗或预防选自以下的病症或病况:肥胖(例如,腹部肥胖);超重;胰岛素抵抗;代谢综合征和其它代谢疾病或病况;脂质病症,例如,低 HDL水平、高LDL水平、高脂血症、高甘油三酯血症或血脂障碍;脂蛋白异常;甘油三酯减少;炎症(例如,肝脏炎症和/或脂肪组织的炎症)、脂肪性肝病;非-酒精性脂肪性肝病;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,例如,心脏病包括冠心病、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;X综合征;血管再狭窄;神经病;视网膜病;神经变性疾病;内皮功能障碍、呼吸功能障碍;胰腺炎;多囊性卵巢综合征;尿酸水平升高;血色病(铁过载);黑棘皮病(皮肤上的深色斑);或癌症(例如,卵巢、乳腺、子宫内膜和结肠癌);或与一种或多种以上疾病或病况有关的另外的病症/病况。在一些实施方案中,使用ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合治疗的疾病或病况与超重(例如,BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$)或太多的体脂肪有关。

[0518] 在一个实施方案中,本公开内容提供了减少体重的方法,包括给予需要减少体重或有需要的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一些实施方案中,受试者是超重的(例如,前-肥胖)。在一些实施方案中,受试者具有 25kg/m^2 或更大的体重指数(BMI)。在另外的实施方案中,受试者具有 25kg/m^2 - 29.9kg/m^2 、 30kg/m^2 - 39.9kg/m^2 、 25kg/m^2 - 39.9kg/m^2 或 25kg/m^2 - 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 - 39.9kg/m^2 或 30kg/m^2 - 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。在另外的实施方案中,受试者具有 40kg/m^2 - 45kg/m^2 或 40kg/m^2 - 50kg/m^2 的 BMI。在一些实施方案中,受试者具有向心性肥胖(例如,腹部区域脂肪过多,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/髋周围比(WHR)。在一些实施方案中,受试者具有外周肥胖(例如,髋上脂肪过多)。在一些实施方案中,受试者具有2型糖尿病。ALK4:ActRIIB拮抗剂或拮抗剂的组合可单独或作为与其它类型的支持性疗法的组合疗法给予。例如,在一些实施方案中,支持性疗法是饮食和/或锻炼。

[0519] 在一个实施方案中,本公开内容提供了减少体重增加的方法,包括给予需要减少

体重增加或有需要的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一些实施方案中,受试者是超重的(例如,前-肥胖)。在一些实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在另外的实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ - $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $25\text{kg}/\text{m}^2$ - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $25\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$ 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 - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$)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。在另外的实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ - $45\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $40\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者具有2型糖尿病。

[0520] 还提供了治疗或预防与过量体重有关的疾病或病况的方法,包括给予需要治疗或预防的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是肥胖。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是胰岛素抵抗。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是选自以下的成员:血脂障碍、高脂血症(总胆固醇水平 $>240\text{ mg}/\text{dL}$)、高胆固醇血症(例如,总胆固醇水平 $>200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>220\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>240\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>250\text{mg}/\text{dL}$ 或 $>275\text{mg}/\text{dL}$)、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 $\geq 190\text{mg}/\text{dL}$)和高甘油三酯血症(例如,空腹TG水平 $\geq 150\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 175\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 300\text{ mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 400\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 499\text{mg}/\text{dL}$)。在某些情况下,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0521] 在另一实施方案中本公开内容提供了减少超重受试者的体重的方法。该方法包括给予超重受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一些实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的体重指数(BMI)。在另外的实施方案中,受试者具有 $25\text{kg}/\text{m}^2$ - $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 、 $25\text{ kg}/\text{m}^2$ - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $25\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$ 或 27 - $40\text{kg}/\text{m}^2$ 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 - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$)的BMI。ALK4:ActRIIB拮抗剂单独或作为组合疗法给予。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0522] 在一个实施方案中本公开内容提供了减少肥胖受试者的体重的方法。该方法包括给予受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。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 - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$ 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,受试者具有向心性肥胖(例如,腹部区域脂肪过多,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/髋周围比(WHR)。在一些实施方案中,受试者具有外周肥胖(例如,髋上脂肪过多)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0523] 在另一实施方案中,本公开内容提供了治疗和/或改善肥胖或与肥胖有关的疾病或病况的方法,包括给予肥胖受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一些实施方案中,受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更大的BMI。在另外的实施方案中,受试者具有 30 - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$ 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。在另

外的实施方案中,受试者具有 $40\text{kg}/\text{m}^2$ - $45\text{kg}/\text{m}^2$ 或 $40\text{kg}/\text{m}^2$ - $50\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一些实施方案中,受试者具有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 - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$)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,受试者具有向心性肥胖(例如,腹部区域脂肪过多,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/髋周围比(WHR)。在一些实施方案中,受试者具有外周肥胖(例如,髋上脂肪过多)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0524] 还提供了治疗或预防与肥胖有关的疾病或病况的方法,包括给予需要治疗或预防的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是选自以下的成员:血脂障碍、高脂血症(总胆固醇水平 $>240\text{mg}/\text{dL}$)、高胆固醇血症(例如,总胆固醇水平 $>200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>220\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>240\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>250\text{mg}/\text{dL}$ 或 $>275\text{mg}/\text{dL}$)、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 $\geq 190\text{mg}/\text{dL}$)和高甘油三酯血症(例如,空腹TG水平 $\geq 150\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 175\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 300\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 400\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 499\text{mg}/\text{dL}$)。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是心血管疾病。在另外的实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是高血压(高的血压)、心肌梗塞、外周动脉疾病、血管调节功能障碍、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。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是肝脏疾病。在一个实施方案中,治疗或预防的肝脏疾病或病况是NAFLD。在一个实施方案中,肝脏疾病是脂肪肝。在一个实施方案中,肝脏疾病是NASH。在另一实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是选自以下的成员:脂肪性肝炎、脂肪变性、纤维化和/或硬化。在某些情况下,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0525] 在另一实施方案中,本公开内容提供了治疗、改善和/或预防2型糖尿病或与糖尿病有关的疾病或病况的方法,包括给予具有2型糖尿病或处于发生2型糖尿病的风险的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。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 - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$)的体重指数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,受试者具有向心性肥胖(例如,腹部区域脂肪过多,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,受试者具有外周肥胖(例如,髋上脂肪过多)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0526] 还提供了治疗、改善或预防与糖尿病有关的疾病或病况的方法,包括给予具有糖尿病的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是选自以下的成员:血脂障碍、高脂血症(总胆固醇水平 $>240\text{mg}/\text{dL}$)、高胆固醇血症(例如,总胆固醇水平 $>200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>220\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>240\text{mg}/\text{dL}$ 、 $>250\text{mg}/\text{dL}$ 或 $>275\text{mg}/\text{dL}$)、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 $\geq 190\text{mg}/\text{dL}$)和高甘油三酯血症(例如,空腹TG水平 $\geq 150\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 175\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 200\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 300\text{mg}/\text{dL}$ 、 $\geq 400\text{mg}/\text{dL}$ 或 $\geq 499\text{mg}/\text{dL}$)。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是心血管疾病。在另外的实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是高血压(高的血压)、心肌梗

塞、外周动脉疾病、血管调节功能障碍或动脉硬化。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是肝脏疾病。在另一实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是选自以下的成员:脂肪性肝病、脂肪性肝炎、脂肪变性和/或硬化。在一个实施方案中,治疗或预防的疾病或病况是选自以下的成员:白内障、阻塞性睡眠呼吸暂停、静脉炎、痛风、骨关节炎、胆囊疾病和高胆固醇。在某些情况下,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。

[0527] 本公开内容还提供了用于改善受试者的血脂概况的方法,包括给予需要这样的治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于减少LDL胆固醇水平或增加HDL-胆固醇水平的方法。在一个实施方案中,受试者具有血脂障碍。在另一实施方案中,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)。在一个实施方案中受试者具有 ≥ 100 mg/dL、 ≥ 130 mg/dL或 ≥ 160 mg/dL的LDL-C)。在一个实施方案中受试者具有 ≥ 150 mg/dL、 ≥ 160 mg/dL、 ≥ 170 mg/dL的TG)。在一个实施方案中,受试者具有升高的血浆胰岛素水平(高胰岛素血症;例如, > 20 ug/ml的空腹胰岛素水平可超过100)。在一些实施方案中,受试者具有II型糖尿病。

[0528] 根据一个实施方案,本公开内容提供了治疗或预防代谢疾病或病症或与代谢疾病或病症有关的病况的方法,包括给予有需要的受试者ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或病况是高血糖症(例如,在空腹状态下或在口服葡萄糖耐受试验期间在葡萄糖给予后, > 130 mg/dL)。在一个实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或病况是脂质代谢疾病、病症或病况。在一个实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或病况是血脂紊乱。在进一步的实施方案中,脂质代谢疾病、病症或病况是选自以下的成员:低HDL水平、高LDL水平、高甘油三酯水平、高脂血症和脂蛋白畸变。在一个实施方案中,受试者具有 > 200 mg/dL、 > 220 mg/dL、 > 240 mg/dL、 > 250 mg/dL或 > 275 mg/dL的总胆固醇水平。在一个实施方案中,受试者具有 < 40 mg/dL、 < 45 mg/dL或 < 50 mg/dL的HDL血清水平)。在一个实施方案中,受试者具有 ≥ 100 mg/dL、 ≥ 130 mg/dL、 ≥ 160 mg/dL或 ≥ 190 mg/dL的LDL血清水平。在一个实施方案中,受试者具有 ≥ 150 mg/dL、 ≥ 175 mg/dL、 ≥ 200 mg/dL、 ≥ 300 mg/dL、 ≥ 400 mg/dL或 ≥ 499 mg/dL的空腹TG水平。在一个实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或病况是葡萄糖代谢疾病、病症或病况。在进一步的实施方案中,葡萄糖代谢疾病、病症或病况是选自以下的成员: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)。在一个实施方案中,治疗的代谢疾病、病症或病况是选自以下的成员:高尿酸水平、NAFLD、脂肪肝、NASH和多囊性卵巢综合征。在一个实施方案中,治疗的受试者具有高胰岛素血症。在一个实施方案中,治疗的受试者是肥胖的(例如,受试者具有腹部肥胖)。在另一实施方案中,治疗的受试者具有II型糖尿病。

[0529] 代谢综合征是包括一组提高心脏病的风险的病症的病况。代谢综合征的主要成分是高体重、心血管参数(高血压、血脂障碍、在血液中高水平的甘油三酯和/或低水平的HDL)、动脉粥样硬化、糖尿病和/或胰岛素抵抗。具有数个这些成分,即代谢综合征的受试者对心脏病高度易感,但每个成分都是风险因素。本公开内容还提供了治疗或预防1、2、3或更多种代谢综合征的上述成分的方法,包括给予需要治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。

[0530] 另外提供了治疗、预防或改善心血管疾病或病况的方法,包括给予有需要的受试

者ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,治疗、预防或改善的心血管疾病或病况是动脉粥样硬化。在一个实施方案中,治疗、预防或改善的心血管疾病或病况是高血压(例如,在休息状态下血压 $>130/80\text{mmHg}$ 或 $>140/90\text{mmHg}$)。在一个实施方案中,心血管疾病是动脉粥样硬化(冠心病疾病)。

[0531] 在一个实施方案中,本公开内容提供了治疗和/或改善炎症性肝脏疾病或病况的方法,包含给予有需要的受试者ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,疾病或病况是NAFLD。在进一步的实施方案中,疾病或病况是脂肪肝。在进一步的实施方案中,疾病或病况是脂肪变性(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))。在进一步的实施方案中,疾病或病况是酒精性脂肪性肝病。

[0532] 本公开内容还提供了改善血糖控制的方法,包括给予需要治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)。在一个实施方案中,给予的受试者具有 >130 、 >135 、 >140 、 >145 或 $>150\text{mg/dL}$ 的空腹血糖水平。在一个实施方案中,给予的受试者在进食后2小时具有 >180 、 >185 、 >190 、 >195 或 $>200\text{mg/dL}$ 的餐后血糖水平。在某些情况下,ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗是对饮食和/或锻炼的辅助。给药还可减少体重或治疗肥胖。在某些情况下,受试者具有2型糖尿病。在某些情况下,受试者具有 $27\text{--}40\text{kg/m}^2$ 的BMI。在某些情况下,受试者具有 $30\text{--}39.9\text{kg/m}^2$ 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。血糖控制的改善可使用本领域已知的技术,例如混餐检验评价。

[0533] 本公开内容还提供了用于在受试者中治疗、预防或改善高血糖症或与高血糖症有关的病况的组合物和方法,包括给予需要这样的治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)。在一个实施方案中,给予的受试者具有 >130 、 >135 、 >140 、 >145 或 $>150\text{mg/dL}$ 的空腹血糖水平。在一个实施方案中,给予的受试者在进食后2小时具有 >180 、 >185 、 >190 、 >195 或 $>200\text{mg/dL}$ 的餐后血糖水平。在一个实施方案中,治疗、预防或改善的结果是选自以下的成员:与治疗前受试者的血清水平比较,葡萄糖的血清水平减少、甘油三酯的血清水平减少、胰岛素的血清水平减少和/或非-酯化脂肪酸的血清水平减少。在一个实施方案中,治疗、预防或改善的结果是与治疗前受试者的身体温度比较,身体温度增加约 0.4°C – 1°C 。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB治疗还减少受试者的体重。

[0534] 在另一实施方案中,本公开内容提供了降低受试者的血浆胰岛素水平的方法,包括给予需要这样的治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)。在一个实施方案中,受试者具有 >130 、 >135 、 >140 、 >145 或 $>150\text{mg/dL}$ 的空腹血糖水平。在一个实施方案中,受试者在进食后2小时具有 >180 、 >185 、 >190 、 >195 或 $>200\text{mg/dL}$ 的餐后血糖水平。在一个实施方案中,受试者是超重的。在一个实施方案中,受试者是肥胖的。在另一实施方案中,受试者具有2型糖尿病。

[0535] 本公开内容还提供了用于在受试者中治疗、预防或改善高血糖症或与高血糖症有关的病况的组合物和方法,包括给予需要这样的治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如,ALK4:ActRIIB异二聚体)。在一个实施方案中,受试者具有 >130 、 >135 、 >140 、 >145 或 $>150\text{mg/dL}$ 的空腹血糖水平。在一个实施方案中,受试者在进食后2 小时具有 >180 、 >185 、 >190 、 >195 或 $>200\text{mg/dL}$ 的餐后血糖水平。在一个实施方案中,治疗、预防或改善

的结果是选自以下的成员：与治疗前受试者的血清水平比较，葡萄糖的血清水平减少、甘油三酯的血清水平减少、胰岛素的血清水平减少和/或非-酯化脂肪酸的血清水平减少。在一个实施方案中，治疗、预防或改善的结果是与治疗前受试者的身体温度比较，身体温度增加约0.4℃-1℃。在一些实施方案中，ALK4:ActRIIB拮抗剂治疗还减少受试者的体重。

[0536] 在另一实施方案中，本公开内容提供了降低受试者的血浆胰岛素水平方法，包括给予需要这样的治疗的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如，ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中，受试者具有>130、>135、>140、>145或>150mg/dL的空腹血糖水平。在一个实施方案中，受试者在进食后2小时具有>180、>185、>190、>195或>200mg/dL的餐后血糖水平。在一个实施方案中，受试者是超重的。在一个实施方案中，受试者是肥胖的。在另一实施方案中，受试者具有2型糖尿病。

[0537] 在另一实施方案中，本公开内容提供了治疗、预防或改善受试者的肝脏疾病的方法，包括给予具有肝脏疾病的受试者有效量的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如，ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合。在一个实施方案中，受试者具有肝脏的炎症。在一个实施方案中，受试者具有NAFLD。在一个实施方案中受试者具有脂肪肝。在另一实施方案中，受试者具有NASH。在一个实施方案中受试者具有脂肪肝。在另一实施方案中，受试者具有酒精性脂肪性肝病。在一个实施方案中，治疗、预防或改善的肝脏疾病是纤维化、瘢痕化、硬化或肝脏衰竭。在另一实施方案中，治疗、预防或改善的肝脏疾病是肝脏癌症。在一个实施方案中，受试者是超重的。在另一实施方案中，受试者是肥胖的。在另一实施方案中，受试者具有2型糖尿病。

[0538] 纤维化通常是指器官或组织中胶原纤维和细胞外基质二者过度沉积，以及细胞数量相对减少。尽管该过程是在损伤后自然伤口愈合的重要特征，但纤维化可导致各种组织和器官(包括例如，肺、肾、肝脏、骨、肌肉和皮肤)的病理性损伤。TGF-β在纤维化中的作用已被广泛研究。然而，其它TGF-β超家族配体也参与纤维化，包括例如，活化素(例如，活化素A和活化素B)和GDF8[Hedger等(2013) Cytokine and Growth Factor Reviews 24:285-295; Hardy等(2015) 93:567-574;和 Cantini等(2008) J Sex Med 5:1607-1622]。因此，在一些实施方案中，本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如，ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于治疗纤维化、特别是纤维化-相关的病症和病况。例如，ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如，ALK4:ActRIIB异二聚体)或这样的拮抗剂的组合可用于治疗或预防以下一种或多种：肺纤维化、超敏感性肺炎、特发性纤维化、肺结核、肺炎、囊性纤维化、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、肾纤维化、肾衰竭、慢性肾疾病、骨纤维化、骨髓纤维化、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、结节病、伴有多脉管炎的肉芽肿病、佩伦涅氏病、肝脏纤维化、威尔逊氏病、糖原贮积病(特别是III、IV、IX和X型)、铁-过载、戈谢病、泽韦格综合征、非酒精性和酒精性脂肪性肝炎、胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、巴-希二氏综合征、手术相关的纤维化、克罗恩病、掌挛缩、纵隔纤维化、肾源性纤维化、腹膜后纤维化、心房纤维化、心内膜心肌纤维化、胰脏纤维化。

[0539] 肾维持血液的许多特征，包括体积、pH平衡、电解质浓度和血压，以及负责毒素和废物过滤。这些功能依赖于肾的肾单位的复杂结构、血液持续流过肾的各种毛细管和通过来自身体其余部分的信号调节肾，包括内分泌激素。肾功能问题表现为直接机制(例如，遗传缺陷、感染或毒素暴露)和自长期应激物例如肥大和超滤进行性发生的间接机制(本身通

常是对肾功能的更直接损伤的结果)。由于肾在血液维持和废物分泌中的重要作用,肾-相关的疾病表现是许多和多变的;它们可综述于Harrison的Principles of Internal Medicine,第18版,McGraw Hill,N.Y.,Part 13,Chp 277-289。

[0540] 如本文所述的,ALK4:ActRIIB拮抗剂在肾疾病模型中具有各种有益作用。特别地,用ALK4:ActRIIB异多聚体治疗减少具有单侧输尿管梗阻的受试者的肾组织损伤、炎症和纤维化。这些数据表明 ALK4:ActRIIB拮抗剂可用于治疗或预防肾疾病、特别是治疗或预防肾疾病的各种并发症(表现),包括例如,肾组织损伤、炎症和/或纤维化。

[0541] 因此,本发明的方法可应用于各种肾-相关疾病或病况。如本文所用的,“肾-相关的疾病或病况”可以指影响肾脏或肾系统的任何疾病、病症或病况。肾-相关疾病或病况的实例包括但不限于慢性肾疾病(或衰竭)、急性肾疾病(或衰竭)、原发性肾疾病、非糖尿病性肾疾病、肾小球肾炎、间质性肾炎、糖尿病性肾疾病、糖尿病性肾病、肾小球硬化症、快速进行性肾小球肾炎、肾纤维化、奥尔波特综合征、IDDM 肾炎、肾小球系膜增生性肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎、新月体肾小球肾炎、肾间质性纤维化、局灶性节段性肾小球硬化症、膜性肾病、微小病变疾病、微量免疫快速进行性肾小球肾炎、IgA肾病、多囊性肾疾病、Dent病、nephrocytinosis、海曼肾炎、常染色体显性(成人)多囊性肾疾病、常染色体隐性(儿童)多囊性肾疾病、急性肾损伤、肾病综合征、肾缺血、足细胞疾病或病症,蛋白尿、肾小球疾病、膜性肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球肾炎、先兆子痫、子痫、肾损伤、胶原血管病、良性体位性(姿势)蛋白尿、IgM肾病、膜性肾病、结节病、糖尿病、由于药物导致的肾损伤、法布里病、氨基酸尿症、范科尼综合征、高血压性肾硬化、间质性肾炎、镰状细胞疾病、血红蛋白尿、肌红蛋白尿、韦格纳肉芽肿病、糖原贮积病1型、慢性肾疾病、慢性肾衰竭、低肾小球滤过率(GFR)、肾血管硬化、狼疮肾炎、ANCA- 阳性微量免疫新月体肾小球肾炎、慢性同种异体移植肾病、肾毒性、肾中毒、肾坏死、肾损伤、肾小球和管损伤、肾功能障碍、肾炎综合征、急性肾衰竭、慢性肾衰竭、近端小管功能障碍、急性肾移植排斥、慢性肾移植排斥、非-IgA肾小球系膜增生性肾小球肾炎、传染后肾小球肾炎、伴有任何类型的肾累及的血管炎、任何遗传性肾疾病、任何间质性肾炎、肾移植衰竭、肾癌、与其它病况有关的肾疾病(例如,高血压、糖尿病和自身免疫疾病)、Dent病、肾胱氨酸病(nephrocytinosis)、海曼肾炎、原发性肾疾病、坍塌性肾小球病、致密沉积物病、冷球蛋白血症相关的肾小球肾炎、Henoch-Schonlein病、传染后肾小球肾炎、细菌心内膜炎、微观多脉管炎、丘-施二氏综合征、抗-GBM-抗体介导的肾小球肾炎、淀粉样变性病、单克隆免疫球蛋白沉积病、原纤维肾小球肾炎、免疫触须样肾小球病、缺血性肾小管损伤、药物-诱导的肾小管-间质性肾炎、毒性肾小管-间质性肾炎、感染性肾小管-间质性肾炎、细菌肾盂肾炎、自多瘤病毒感染或HIV感染产生的病毒感染性肾小管-间质性肾炎、代谢-诱导的肾小管-间质性肾炎、混合结缔组织病、管型肾病、可自尿酸或草酸或药物-诱导的晶体沉积产生的晶体肾病、急性细胞肾小管-间质性同种异体移植排斥、自淋巴瘤或移植后淋巴增生性疾病产生的肿瘤浸润疾病、肾的阻塞性疾病、血管疾病、血栓形成性微血管病、肾血管硬化、动脉粥样化栓塞疾病、混合结缔组织病、结节性多动脉炎、神经钙蛋白-抑制剂诱导的血管疾病、急性细胞血管同种异体移植排斥、急性体液同种异体移植排斥、早期肾功能减退(ERFD)、晚期肾疾病(ESRD)、肾静脉血栓症、急性肾小管坏死、急性间质性肾炎、确立的慢性肾疾病、肾动脉狭窄、缺血性肾病、尿毒症、药物和毒素-诱导的慢性肾小管间质性肾炎、逆流性肾病、肾结石、古德帕斯丘综合征、正细胞性正色

素性贫血、肾贫血、糖尿病性慢性肾疾病、IgG4-相关疾病、冯希-林二氏综合征、结节性硬化症、肾消耗病、髓状囊性肾疾病、肾细胞癌、腺癌、肾胚胎瘤、淋巴瘤、白血病、低唾液酸化病症、慢性环孢霉素肾病、肾再灌注损伤、肾发育不良、氮质血症、双侧动脉闭塞、急性尿酸肾病、血容量不足、急性双侧梗阻性尿路病、血钙过高肾病、溶血性尿毒症综合征、急性尿潴留、恶性肾硬化、产后肾小球硬化症、硬皮病、非-古德帕斯丘抗-GBM 病、微观结节性多动脉炎、过敏性肉芽肿病、急性放射性肾炎、链球菌感染后肾小球肾炎、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、镇痛剂肾病、动静脉瘘、动静脉移植、透析、异位肾、髓质海绵肾、肾性骨营养不良、孤立肾、肾积水、微白蛋白尿、尿毒症、血尿、高脂血症、低白蛋白血症、脂肪尿、酸中毒、血钾过多和水肿。

[0542] 在一些实施方案中,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂或这样的拮抗剂的组合(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体例如ALK4:ActRIIB 异二聚体)可用于治疗或预防慢性肾疾病,任选地与一种或多种用于治疗慢性肾疾病的支持性疗法组合。在一些实施方案中,本公开内容的 ALK4:ActRIIB拮抗剂或这样的拮抗剂的组合(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体例如ALK4:ActRIIB异二聚体)可用于治疗或预防慢性肾疾病的一种或多种并发症(症状或表现),任选地与一种或多种用于治疗慢性肾疾病的支持性疗法组合。在一些实施方案中,本公开内容的 ALK4:ActRIIB拮抗剂或这样的拮抗剂的组合(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体例如ALK4:ActRIIB异二聚体)可用于治疗或预防晚期肾衰竭,任选地与一种或多种用于治疗晚期肾疾病的支持性疗法组合。慢性肾脏疾病(CKD),亦称为慢性肾疾病,为在几个月或几年内肾功能的渐进性损失。肾功能恶化的症状可包括感觉一般不适和食欲下降。通常,诊断慢性肾病被是由于筛查已知有肾脏疾病风险的人群,例如高血压或糖尿病人群和具有CKD相关血液的人群。当它导致其公认的并发症之一,例如心血管疾病、贫血或心包炎时,也可能确定这种疾病。最近的专业指南将CKD的严重程度分为5期,1期是最轻微的,通常导致很少的症状,5期是严重疾病,如果不治疗,预期寿命很差。5 期CKD通常被称为晚期肾病,终末期肾病或终末期肾功能衰竭,与现在过时的术语慢性肾衰竭或慢性肾脏衰竭在很大程度上是同义词;并且通常意味着患者需要肾替代治疗,这可能涉及透析形式,但理想地构成肾脏移植。CKD最初没有特定的症状,一般只检测到尿中血清肌酐或蛋白质的增加。随着肾功能下降,可能表现出如下所述的各种症状。由于体液超负荷以及由肾脏通过肾素-血管紧张素系统产生的血管活性激素的产生,血压可能升高,增加了患高血压和/或患充血性心力衰竭的风险。尿素可能积聚,导致氮质血症,最终导致尿毒症(症状范围为嗜睡到心包炎和脑病)。由于体循环较高,尿素以高浓度排泄在外分泌汗液中,随着汗液蒸发在皮肤上结晶(“尿毒性霜”)。钾可能积聚在血液中(高钾血症伴有各种症状,包括不适和可能致命的心律失常)。高钾血症通常在肾小球滤过率低于 $20\text{-}25\text{ml/min/1.73m}^2$ 时才出现,此时肾脏的排钾能力下降。酸中毒(导致钾的细胞外转移)和缺乏胰岛素会加剧CKD中的高钾血症。促红细胞生成素合成可能会降低,引起贫血。可能发生流体量超负荷症状,从轻度水肿到威胁生命的肺水肿。由于磷酸盐排泄减少,高磷酸盐血症通常在肾小球滤过率降低之后发生。高磷酸盐血症与心血管风险增加有关,是血管钙化的直接刺激。低钙血症可能表现出来,这通常是由成纤维细胞生长因子-23的刺激引起的。骨细胞负责增加FGF23的产生,FGF23是酶1- α -羟化酶(负责将25-羟基胆钙化醇转化为1,25-二羟基维生素D3)的有效抑制剂。后来,这进展到继发性甲状旁腺功能亢进、肾性骨营养不良和血管钙化,进一步损害心脏功能。代谢性酸中

毒(由于硫酸盐、磷酸盐、尿酸等的积累)可能发生,并通过过量的酸作用于酶引起酶活性改变;并且通过由于过量的酸(酸血症)促进高钾血症而增加心脏和神经元膜的兴奋性。酸中毒也是由于从近端小管的细胞产生足够的氨的能力下降。缺铁性贫血,随着肾功能降低而患病率上升,在需要血液透析的患者中尤其普遍。原因是多方面的,但是包括炎症增加、促红细胞生成素减少和高尿酸血症,导致骨髓抑制。CKD人群患有动脉粥样硬化加速,比一般人群更容易患心血管疾病。患有CKD和心血管疾病的患者往往比仅患有后者的患者预后显著更差。

[0543] 如本文所用的,“与……组合”、“……的组合”或“联合给予”是指任何形式的给予,使得另外的疗法(例如第二、第三、第四等)在体内仍有效(例如,多种化合物在患者中同时有效,其可包括这些化合物的协同作用)。有效性可能不关联到试剂在血液、血清或血浆中可测量的浓度。例如,不同的治疗化合物可在相同的制剂中或在分开的制剂中同时或序贯地,和以不同的时间表给予。因此,接受这样的治疗的个体可获益于不同的疗法的组合效果。本公开内容的一种或多种 ALK4:ActRIIB拮抗剂可与一种或多种其它另外的试剂或支持性疗法同时、在其之前或随后给予。一般而言,各治疗剂以对该特定试剂所确定的剂量和/或时间表给予。在方案中使用的特定组合应考虑本公开内容的拮抗剂与疗法和/或需求的相容性。

[0544] 7. 药物组合物

[0545] 在某些方面,本公开内容的ALK4:ActRIIB拮抗剂(例如, ALK4:ActRIIB异多聚体)或这样的拮抗剂的组合可单独或作为药物制剂(亦称为治疗组合物或药物组合物)的组分给予。药物制剂是指呈允许其中包含的活性成分(例如,本公开内容的试剂)的生物学活性是有效的形式和不包含对制剂所给予的受试者有不可接受的毒性的另外的组分的制剂。本发明的化合物可经配制以对人或兽医药物使用方便的任何方式给予。例如,本公开内容的一种或多种试剂可用药学上可接受的载体配制。药学上可接受的载体是指药物制剂中并非活性成分的成分,其通常对受试者是无毒的。药学上可接受的载体包括但不限于,缓冲剂、赋形剂、稳定剂和/或防腐剂。一般而言,本公开内容使用的药物制剂当给予受试者时是无热原、生理学可接受的形式。并非本文所述的那些的治疗上有用的试剂,其可任选地包括在上述制剂中,可在本公开内容的方法中与本发明的试剂组合给予。

[0546] 在某些实施方案中,组合物将胃肠外给予[例如,通过静脉内(I.V.)注射、动脉内注射、骨内注射、肌内注射、鞘内注射、皮下注射或皮内注射]。适合于胃肠外给予的药物组合物可包含本公开内容的一种或多种试剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、混悬液或乳液、或可在临用前重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末的组合。可注射溶液或分散液可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、助悬剂、增稠剂或赋予制剂与预期受体的血液等渗的溶质。可用于本公开内容的药物制剂的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、植物油(例如,橄榄油)、可注射有机酯(例如,油酸乙酯)和其合适的混合物。适当的流动性可例如,通过使用包衣材料(例如,卵磷脂),在分散液的情况下通过维持需要的粒度,和通过使用表面活性剂来维持。

[0547] 在一些实施方案中,本公开内容的治疗方法包括从植入物或装置,系统或局部给予药物组合物。此外,药物组合物可以递送至靶组织部位(例如,骨髓或肌肉)的形式被包封

或注射。在某些实施方案中,本公开内容的组合物可包括能够递送本公开内容的一种或多种试剂至靶组织部位(例如,骨髓或肌肉),为发展中的组织提供结构,和最好能够再吸收至体内的基质。例如,基质可提供本公开内容的一种或多种试剂的减慢释放。这样的基质可由目前用于其它植入的医学应用的材料构成。

[0548] 基质材料的选择可基于以下一项或多项进行:生物相容性、生物降解能力、机械性质、美容外观和界面性质。本发明的组合物的特定应用将定义合适的制剂。用于组合物的潜在基质可以是生物可降解的和化学上确定的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸和聚酞。其它潜在的材料是生物可降解的和生物学上充分确定的,包括例如,骨或皮肤胶原。其它基质包括纯的蛋白或细胞外基质组分。其它潜在的基质是非-生物可降解的和化学上确定的,包括例如,烧结的羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可包含任何上述类型的材料的组合,包括例如,聚乳酸和羟基磷灰石或胶原和磷酸三钙。生物陶瓷可在组分中改变(例如,钙-铝酸盐-磷酸盐)和经加工以改变孔径、粒度、颗粒形状和生物降解能力的一项或多项。

[0549] 在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物可经局部给予。“局部应用”或“局部地”意指药物组合物与身体表面(包括例如,皮肤、伤口部位和粘膜)接触。局部药物组合物可具有各种应用形式,和通常包括含药物层,在局部给予组合物后其适合位于组织附近或与组织直接接触。适合于局部给予的药物组合物可包含组合配制为液体、凝胶、霜剂、洗剂、软膏剂、泡沫、糊剂、擦剂(putty)、半固体或固体的本公开内容的一种或多种ALK4:ActRIIB拮抗剂。呈液体、凝胶、霜剂、洗剂、软膏剂、泡沫、糊剂或擦剂形式的组合物可通过涂覆、喷雾、涂抹、轻拍或滚擦组合物至靶组织上来施用。组合物还可被浸渍至无菌敷料、透皮贴剂、石膏和绷带中。擦剂、半固体或固体形式的组合物可以是可变形的。它们可以是弹性的或非弹性的(例如,柔性或刚性)。在某些方面,组合物形成复合材料的一部分,和可包括纤维、颗粒或具有相同或不同的组分的多个层。

[0550] 呈液体形式的局部组合物可包括药学上可接受的溶液剂、乳剂、微乳剂和混悬剂。除了活性成分外,液体剂量形式可包含本领域常用的惰性稀释剂,包括例如,水或其它溶剂、增溶剂和/或乳化剂[例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇或1,3-丁二醇、油(例如,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇、去水山梨糖醇的脂肪酸酯和其混合物]。

[0551] 局部凝胶、霜剂、洗剂、软膏剂、半固体或固体组合物可包括一种或多种增稠剂,例如多糖、合成的聚合物或基于蛋白的聚合物。在本发明的一个实施方案中,在本文中胶凝剂是一种合适地是无毒的和产生需要的粘度的试剂。增稠剂可包括聚合物、共聚物和其单体:乙烯基吡咯烷酮、甲基丙烯酰胺、丙烯酰胺N-乙烯基咪唑、羧基乙烯基、乙烯基酯、乙烯基醚、硅酮、聚环氧乙烷、聚乙二醇、乙烯基醇、丙烯酸钠、丙烯酸酯、马来酸、NN-二甲基丙烯酰胺、双丙酮丙烯酰胺、丙烯酰胺、丙烯酰基吗啉、普卢兰尼克、胶原、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯基醇、聚乙烯、聚乙烯基硅酸酯、被糖(例如,蔗糖、葡萄糖、葡糖胺、半乳糖、海藻糖、甘露糖或乳糖)取代的聚丙烯酸酯、酰胺基丙烷磺酸、四甲氧基原硅酸酯、甲基三甲氧基原硅酸酯、四烷氧基原硅酸酯、三烷氧基原硅酸酯、二醇、丙二醇、甘油、多糖、藻酸盐、葡聚糖、环糊精、纤维素、改性纤维素、氧化纤维素、壳聚糖、甲壳质、瓜儿胶、角叉菜胶、透明质酸、菊糖、淀粉、改性淀粉、琼脂糖、甲基纤维素、植物树胶、hyaluronans、水凝胶、明胶、氨基

葡聚糖、羧基甲基纤维素、羟基乙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、果胶、低-甲氧基果胶、交联葡聚糖、淀粉-丙烯腈接枝共聚物、淀粉钠聚丙烯酸酯、羟基乙基甲基丙烯酸酯、羟基乙基丙烯酸酯、聚乙烯、聚乙基乙基醚、聚甲基甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚氨酯、聚烷酸酯、聚乳酸、聚乳酸酯、聚(3-羟基丁酸酯)、磺酸化水凝胶、AMPS(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、SEM(磺基乙基甲基丙烯酸酯)、SPM(磺基丙基甲基丙烯酸酯)、SPA(磺基丙基丙烯酸酯)、N,N-二甲基-N-甲基丙烯基氧基乙基-N-(3-磺基丙基)铵甜菜碱、甲基丙烯酸酰胺基丙基-二甲基铵磺基甜菜碱、SPI(衣康酸-双(1-丙基磺酸-3)酯二钾盐)、衣康酸、AMBC(3-丙烯酰胺基-3-甲基丁酸)、 β -羧基乙基丙烯酸酯(丙烯酸二聚体)和马来酸酐-甲基乙基醚聚合物、其衍生物、其盐、其酸和其组合。在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物可口服给予,例如,以胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用矫味基质,例如蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶)、粉剂、颗粒剂、在水性或非水性液体中溶液剂或混悬剂、水包油或油包水液体乳剂、或酏剂或糖浆剂、或软锭剂(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或口腔洗剂的形式,各自包含预定量的本公开内容的化合物和任选地一种或多种其它活性成分。本公开内容的化合物和任选地一种或多种其它活性成分还可作为巨丸剂、药糖剂或糊剂给予。

[0552] 在用于口腔给予的固体剂型(例如,胶囊剂、片剂、丸剂、糖锭剂、粉剂和颗粒剂)中,本公开内容的一种或多种化合物可与一种或多种药学上可接受的载体混合,其包括例如,柠檬酸钠、磷酸二钙、填充剂或膨胀剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖和硅酸)、结合剂(例如,羧基甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、湿润剂(例如,甘油)、崩解剂(例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、硅酸盐和碳酸钠)、溶解阻滞剂(例如,石蜡)、吸收加速剂(例如,季铵化合物)、浸湿剂(例如,鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯)、吸收剂(例如,高岭土和膨润土)、润滑剂(例如,滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠)、着色剂和其混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,药物制剂(组合物)还可包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可用作软和硬填充明胶胶囊的填充物,使用一种或多种赋形剂包括例如,乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇。

[0553] 用于口腔给予药物组合物的液体剂型可包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了活性成分外,液体剂型可包含本领域常用的惰性稀释剂,包括例如,水或其它溶剂、增溶剂和/或乳化剂[例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇或1,3-丁二醇、油(例如,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇、去水山梨糖醇的脂肪酸酯和其混合物]。除了惰性稀释剂外,口服制剂还可包括助剂,包括例如,浸湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、芳香剂、防腐剂和其组合。

[0554] 混悬剂,除了活性化合物外,还可包含助悬剂,包括例如,乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇、去水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂、西黄蓍胶和其组合。

[0555] 微生物的作用和/或生长的预防可通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂来确保,其包括例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇和苯酚山梨酸。

[0556] 在某些实施方案中,组合物中可能需要包括等渗剂,包括例如,糖或氯化钠。此外,可通过包括延迟吸收的试剂包括,例如,单硬脂酸铝和明胶导致可注射药物形式的延长吸

收。

[0557] 应理解,剂量方案由主治医生考虑各种因素来确定,所述因素改变本公开内容的一种或多种试剂的作用。在促进红细胞形成的 ALK4:ActRIIB拮抗剂的情况下,各种因素可包括但不限于,患者的红细胞计数、血红蛋白水平、需要的目标红细胞计数、患者的年龄、患者的性别、患者的饮食、可促进红细胞水平降低的任何疾病的严重性、给药次数和其它临床因素。添加其它已知的活性剂至最终组合中也可影响剂量。可通过定期评估红细胞水平、血红蛋白水平、网织红细胞水平和生血过程的其它指示物中的一项或多项监测进展。

[0558] 在某些实施方案中,本公开内容还提供了用于体内产生本公开内容的一种或多种试剂的基因疗法。这样的疗法通过引入试剂序列至具有上文列出的一种或多种病症的细胞或组织来实现其治疗效果。递送试剂序列可例如,通过使用重组表达载体例如嵌合病毒或胶体分散系统来实现。本公开内容的一种或多种试剂序列的优选的治疗递送使用靶向脂质体进行。

[0559] 本文教导的可用于基因疗法的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘或RNA病毒(例如,逆转录病毒)。逆转录病毒载体可以是鼠或禽逆转录病毒的衍生株。其中可插入单一外源基因的逆转录病毒载体的实例包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)。许多另外的逆转录病毒载体可掺有多种基因。所有这些载体可传递或掺有用于可选择标记的基因,使得转导的细胞可鉴定和产生。通过连接例如,糖、糖脂或蛋白,可使得逆转录病毒载体为靶标特异性的。优选的靶向通过使用抗体实现。本领域技术人员将认识到,特定的多核苷酸序列可插入逆转录病毒基因组或连接至病毒被膜以允许包含本公开内容的一种或多种试剂的逆转录病毒载体的靶标特异性递送。

[0560] 或者,组织培养细胞可通过常规磷酸钙转染,用编码逆转录病毒结构基因(gag、pol和env)的质粒,直接转染。然后这些细胞用包含目的基因的载体质粒转染。得到的细胞释放逆转录病毒载体至培养基。

[0561] 用于本公开内容的一种或多种试剂的另一靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括例如,大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合型胶束和脂质体。在某些实施方案中,本公开内容的优选的胶体系统是脂质体。脂质体是人造膜囊泡,其可体外和体内用作递送载体。RNA、DNA和完整的病毒体可包封在水性内部内和以生物活性形式递送至细胞[Fraley,等(1981)Trends Biochem.Sci.,6:77]。使用脂质体载体的有效基因传递的方法是本领域已知的[Mannino,等(1988)Biotechniques,6:682, 1988]。

[0562] 脂质体组分通常是磷脂的组合,其可包括甾族化合物(例如,胆固醇)。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。其它磷脂或其它脂质也可使用,包括例如磷脂酰基化合物(例如,磷脂酰基甘油、磷脂酰基胆碱、磷脂酰基丝氨酸、磷脂酰基乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂)、卵磷脂酰基胆碱、二棕榈酰基磷脂酰基胆碱和二硬脂酰基磷脂酰基胆碱。脂质体的靶向还可能基于例如,器官-特异性、细胞-特异性和细胞器-特异性,并且是本领域已知的。

[0563] 通过引用并入

[0564] 本文提及的所有出版物和专利通过引用以其整体结合到本文中,如同每个单独的

出版物或专利特别和独立地指示通过引入并入。

[0565] 尽管已经论述了本发明的具体实施方案,但上述说明书是说明性的而非限制性的。在阅读本说明书和随后的权利要求书后,许多变化对本领域技术人员而言将变得显而易见。本发明的整个范围应通过权利要求书以及它们整个范围的等同方案和说明书以及这样的变化来确定。

[0566] 例证

[0567] 本发明已总体上进行了描述,参照以下实施例将更容易理解,实施例仅为说明本发明的某些实施方案的目的包括在内,和不意图限制本发明。

[0568] 实施例1. ALK4:ActRIIB异二聚体的产生

[0569] 申请人构建了可溶性ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异聚复合物,其包含人 ActRIIB和人 ALK4的细胞外结构域,它们用位于细胞外结构域和Fc 结构域之间的接头各自单独地融合至Fc结构域。各个构建体分别被称为ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽,和各自的序列在下文提供。

[0570] 与ActRIIB-Fc或ALK4-Fc同二聚体复合物相反,促进形成 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异聚复合物的方法是在Fc结构域的氨基酸序列中引入改变以指导不对称的异聚复合物的形成。使用Fc结构域制备不对称的相互作用对的许多不同的方法描述于本公开内容。

[0571] 在一种方法中,分别以SEQ ID NOs:39-41和42-44的ActRIIB-Fc 和ALK4-Fc多肽序列举例说明,一个Fc结构域经改变以在相互作用界面处引入阳离子氨基酸,而另一个Fc结构域经改变以在相互作用界面处引入阴离子氨基酸。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自使用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列:

[0572] MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO:38)。

[0573] ActRIIB-Fc多肽序列 (SEQ ID NO:39) 显示如下:

[0574] 1 MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS

[0575] 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE

[0576] 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPTGGGTHTCPPC

[0577] 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

[0578] 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

[0579] 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPVDIAV

[0580] 301 EWE SNGQPEN NYKTTTPVLKSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

[0581] 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:39) _

[0582] 前导(信号)序列和接头用下划线表示。为了促进形成 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体而不是任一可能的同二聚体复合物,两个氨基酸置换(用赖氨酸替换酸性氨基酸)可被引入至ActRIIB融合蛋白的Fc结构域,如上文通过双下划线所示的。SEQ ID NO:39的氨基酸序列可任选地以从C-末端除去赖氨酸(K)提供。

[0583] 该ActRIIB-Fc融合蛋白由以下核酸序列 (SEQ ID NO:40) 编码:

[0584] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC

[0585] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG

[0586] 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC

- [0587] 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
- [0588] 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
- [0589] 251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
- [0590] 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
- [0591] 351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
- [0592] 401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
- [0593] 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAAA
- [0594] 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
- [0595] 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
- [0596] 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
- [0597] 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
- [0598] 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
- [0599] 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
- [0600] 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG
- [0601] 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
- [0602] 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
- [0603] 951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CTTTCTTCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
- [0604] 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
- [0605] 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
- [0606] 1101 TAAA (SEQ ID NO:40)
- [0607] 成熟的ActRIIB-Fc融合多肽(SEQ ID NO:41)如下和可任选地以从C-末端除去赖氨酸(K)提供。
- [0608] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
- [0609] 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
- [0610] 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
- [0611] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
- [0612] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
- [0613] 251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLKSDGSF
- [0614] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK
- [0615] (SEQ ID NO:41)
- [0616] 互补形式的ALK4-Fc融合多肽(SEQ ID NO:42)如下:
- [0617] 1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
- [0618] 51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
- [0619] 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGGGTHTCPPCPA PELLGGPSVF
- [0620] 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
- [0621] 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
- [0622] 251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
- [0623] 301 DTTTPVLDSG DLSFLYS DLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTKLSL
- [0624] 351 SLSPG (SEQ ID NO:42)

[0625] 前导序列和接头用下划线表示。为了指导含上述SEQ ID NOs:39 和41的ActRIIB-Fc融合多肽的异二聚体形成,两个氨基酸置换(用天冬氨酸替换赖氨酸)可被引入至ALK4-Fc融合多肽的Fc结构域,如上文通过双下划线所示的。SEQ ID NO:42的氨基酸序列可任选地以C-末端添加赖氨酸(K)提供。

[0626] 该ALK4-Fc融合蛋白由以下核酸(SEQ ID NO:43)编码:

[0627] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
[0628] 51AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
[0629] 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
[0630] 151GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
[0631] 201GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
[0632] 251ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
[0633] 301TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
[0634] 351TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAAGTCACA
[0635] 401 CATGCCACCC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
[0636] 451CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
[0637] 501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
[0638] 551TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
[0639] 601CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
[0640] 651CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
[0641] 701ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
[0642] 751CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
[0643] 801GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
[0644] 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
[0645] 901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
[0646] 951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
[0647] 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
[0648] 1051 TCCCTGTCTC CGGGT (SEQ ID NO:43)

[0649] 成熟的ALK4-Fc融合蛋白序列(SEQ ID NO:44)如下和可任选地以C-末端添加赖氨酸(K)提供。

[0650] 1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
[0651] 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
[0652] 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
[0653] 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
[0654] 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
[0655] 251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSGDSFFLYSDLTVDKS
[0656] 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:44)

[0657] 分别为SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:44的ActRIIB-Fc和 ALK4-Fc蛋白可自CHO细胞系共-表达和纯化,以产生包含 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc的异聚复合物。

[0658] 在使用不对称的Fc融合蛋白促进异多聚体复合物的形成的另一方法中,Fc结构域

经改变以引入互补疏水相互作用和另外的分子间二硫键,如在分别为SEQ ID NOs:45-46和47-48的ActRIIB-Fc和 ALK4-Fc多肽序列中举例说明的。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自使用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列:MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO:38)。

[0659] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:45)如下文所示:

[0660] 1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS

[0661] 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE

[0662] 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC

[0663] 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

[0664] 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

[0665] 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV

[0666] 301 EWESNGQPENN YKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

[0667] 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:45)

[0668] 前导(信号)序列和接头用下划线表示。为了促进形成 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体而不是任一可能的同二聚体复合物,两个氨基酸置换(用半胱氨酸替换丝氨酸和用色氨酸替换苏氨酸)可被引入至融合蛋白的Fc结构域,如上文通过双下划线所示的。SEQ ID NO: 45的氨基酸序列可任选地以从C-末端除去赖氨酸(K)提供。

[0669] 成熟的ActRIIB-Fc融合多肽如下:

[0670] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

[0671] 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

[0672] 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

[0673] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS

[0674] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC

[0675] 251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF

[0676] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[0677] (SEQ ID NO:46)

[0678] 互补形式的ALK4-Fc融合多肽(SEQ ID NO:47)如下和可任选地以从C-末端除去赖氨酸(K)提供。

[0679] 1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGV QALLCACTSC LQANYTCETD

[0680] 51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD

[0681] 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGGGTHTCPPCPA PELLGGPSVF

[0682] 15 1LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP

[0683] 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG

[0684] 251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY

[0685] 301 KTPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL

[0686] 351 SLSPGK (SEQ ID NO:47)

[0687] 前导序列和接头用下划线表示。为了指导含上述SEQ ID NOs:45 和46的ActRIIB-Fc融合多肽的异二聚体形成,四个氨基酸置换可被引入至ALK4融合多肽的Fc结构域,如上

文通过双下划线所示的。SEQ ID NO:47的氨基酸序列可任选地以从C-末端除去赖氨酸(K)提供。

[0688] 成熟的ALK4-Fc融合蛋白序列如下和可任选地以从C-末端除去赖氨酸(K)提供。

[0689] 1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV

[0690] 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG

[0691] 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

[0692] 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN

[0693] 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL

[0694] 251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LVSKLTVDKS

[0695] 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:48)

[0696] 分别为SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:48的ActRIIB-Fc和 ALK4-Fc蛋白可自CHO细胞系共-表达和纯化,以产生包含 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc的异聚复合物。

[0697] 各种ALK4-Fc:ActRIIB-Fc复合物的纯化可通过一系列柱色谱步骤实现,包括例如,以任何次序的三个或更多个以下步骤:蛋白A色谱、Q sepharose色谱、phenylsepharose色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0698] 实施例2.与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体比较, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的配体结合特征

[0699] 基于BiacoreTM-的结合测定法用于比较上述ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 异二聚体复合物与ActRIIB-Fc和ALK4-Fc同二聚体复合物的配体结合选择性。使用抗-Fc抗体将ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体、ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体独立地捕获到系统上。注入配体和允许流经捕获的受体蛋白。结果在下表中概述,其中表示最有效的配体陷阱的配体离解速率(k_d)通过灰色阴影表示。

[0700]

与 ActRIIB-Fc 同二聚体和 ALK4-Fc 同二聚体比较, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 异二聚体的配体结合特征									
配体	ActRIIB-Fc 同二聚体			ALK4-Fc 同二聚体			ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 异二聚体		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
活化素 A	1.2×10^7	2.3×10^{-4}	19	5.8×10^5	1.2×10^{-2}	20000	1.3×10^7	1.5×10^{-4}	12
活化素 B	5.1×10^6	1.0×10^{-4}	20	无结合			7.1×10^6	4.0×10^{-5}	6
BMP6	3.2×10^7	6.8×10^{-3}	190	---			2.0×10^6	5.5×10^{-3}	2700
BMP9	1.4×10^7	1.1×10^{-3}	77	---			短暂*		3400
BMP10	2.3×10^7	2.6×10^{-4}	11	---			5.6×10^7	4.1×10^{-3}	74
GDF3	1.4×10^6	2.2×10^{-3}	1500	---			3.4×10^6	1.7×10^{-2}	4900
GDF8	8.3×10^5	2.3×10^{-4}	280	1.3×10^5	1.9×10^{-3}	15000†	3.9×10^5	2.1×10^{-4}	550
GDF11	5.0×10^7	1.1×10^{-4}	2	5.0×10^6	4.8×10^{-3}	270†	3.8×10^7	1.1×10^{-4}	3
* 由于相互作用的短暂性质而不确定									
† 极低信号									
--- 未测试									

[0701] 这些比较性结合数据证实相对于ActRIIB-Fc或ALK4-Fc同二聚体,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体具有改变的结合特征/选择性。ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体显示与任一同二聚体比较,与活化素B的结合增强,保留如ActRIIB-Fc同二聚体所观察到的与活化素A、GDF8和GDF11的强结合,和显示与BMP9、BMP10和GDF3结合显著减少。特别地,对ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体,BMP9显示低或无可观察量的亲和力,尽管该配体强烈结合ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体。像ActRIIB-Fc同二聚体,异二聚体保留与BMP6中等-水平结合。参见图6。

[0702] 此外,A-204报告基因测定法用于评价ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体对通过活化素A、活化素B、GDF11、GDF8、BMP10和BMP9的信号传导的影响。细胞系:人横纹肌肉瘤(源自肌肉)。报告载体:pGL3 (CAGA) 12(描述于Dennler等,1998,EMBO 17:3091-3100)。CAGA12基序存在于TGF- β 响应基因(PAI-1基因),因此该载体通常用于通过Smad2和3发出信号的因子。实例性A-204报告基因测定法在下文概述。

[0703] 第1天:将A-204细胞分到48-孔板中。

[0704] 第2天:A-204细胞用10ug pGL3 (CAGA) 12或pGL3 (CAGA) 12 (10 ug)+pRLCMV (1ug) 和Fugene转染。

[0705] 第3天:加入因子(稀释至培养基+0.1%BSA)。在加入细胞之前,抑制剂需要与因子预孵育约1小时。约6小时后,细胞用PBS漂洗,然后裂解。

[0706] 在上述步骤后,申请人进行萤光素酶测定法。

[0707] 在该测定法中ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体二者经检测为活化素A、活化素B、GDF11和GDF8的有效的抑制剂。特别地,如在图13中举例说明的比较性同二聚体/异二聚体IC₅₀数据可见到的,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体抑制活化素A、活化素B、GDF8和GDF11信号传导途径,类似于ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体。然而,与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体比较,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体对BMP9和BMP10信号传导途径的抑制显著减少。该数据与上述结合数据一致,其中观察到ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体二者显示与活化素A、活化素B、GDF8和GDF11强结合,但与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体比较,BMP10和BMP9具有显著减少的对ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的亲和力。

[0708] 总之,这些数据因此证实与ActRIIB-Fc同二聚体比较,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体是活化素B、活化素A、GDF8和GDF11的更有选择性的拮抗剂。因此,在其中这样的选择性拮抗作用是有利的某些应用中ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体比ActRIIB-Fc同二聚体更实用。实例包括治疗应用,其中需要保留活化素A、活化素B、活化素AB、GDF8和GDF11的一种或多种的拮抗作用,但使BMP9、BMP10、GDF3和BMP6的一种或多种的拮抗作用最小化。

[0709] 实施例3.与ActRIIB-Fc同二聚体比较,在鼠中ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的活性特征

[0710] 同二聚体和异二聚体复合物在鼠中测试以研究它们体内活性特征的差异。野生型C57BL/6小鼠经皮下给予ActRIIB-Fc同二聚体(10 mg/kg)、ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体(3或10mg/kg)或溶媒(磷酸盐缓冲盐水,PBS)每周两次,持续4周,在大约10周龄开始(n=9只小鼠/组)。ALK4-Fc同二聚体未进行体内测试,因为在无细胞条件下其不能以高亲和力结合配体,如通过表面等离子体共振测定的。研究终点包括:体重;总无脂肪质量和总脂肪

质量,在基线和研究完成(4周) 时通过核磁共振(NMR)测定;总骨矿物密度,在基线和4周时通过双重能量x-射线吸收光度法(DEXA)测定;和腓肠肌、股直肌和胸肌肌肉的重量,在4周时测定。

在野生型小鼠中 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 复合物的活性				
终点 (4 wk)	溶媒	ActRIIB-Fc 同 二聚体 10 mg/kg	ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 异二 聚体	
			10 mg/kg	3 mg/kg
自基线的体重变化	↑ 15%	↑ 38% **	↑ 41% **	↑ 33% **
自基线的总无脂肪质量变化	↓ 1%	↑ 5% **	↑ 5% **	↑ 5% **
[0711] 自基线的总脂肪质量变化	↑ 5%	↓ 3.6% **	↓ 3.5% **	↓ 3.5% **
自基线的总骨矿物密度变化	↑ 8%	↑ 14% *	↑ 12% *	↑ 11%
腓肠肌重量†	23	36 **	35 **	30 **
股直肌重量†	11.5	17 **	16 **	14 **
胸肌重量†	15	23 **	28 **	23 **
* $P < 0.05$, 对比溶媒				
** $P < 0.01$, 对比溶媒				
† 合并的左和右肌肉重量, 标准化至股长度(mg/mm)以控制身体大小				

[0712] 研究结果在上表中概述。如预期的,ActRIIB-Fc同二聚体引起身体组成的显著变化,许多与GDF8和活化素抑制的已知效果一致。在研究期间与溶媒处理的对照比较,用ActRIIB-Fc同二聚体处理野生型小鼠超过双倍体重增加。与溶媒比较,伴随该净体重增加,总无脂肪质量和总骨矿物密度显著增加,以及总脂肪质量显著减少。应认识到,在无脂肪和脂肪组织中标准化(基于百分数)的变化在它们对绝对变化的对应性方面不同,因为无脂肪质量(通常约70%的小鼠体重)显著大于脂肪质量(通常约10%的体重)。在用ActRIIB-Fc同二聚体处理期间与溶媒对照比较,检查的各个骨骼肌肉,包括腓肠肌、股直肌和胸肌,在重量方面全部显著增加。

[0713] ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体产生显著类似于ActRIIB-Fc同二聚体的某些作用,尽管两种复合物的配体选择性不同。如上表所示的,用10mg/kg的剂量水平的ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体处理小鼠,匹配、几乎匹配或超过相同的剂量水平的ActRIIB-Fc同二聚体对所列的所有终点的作用。与10mg/kg比较,对于数个终点,3mg/kg的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的作用被轻度减少,因此提供了剂量-作用关系的证据。

[0714] 因此,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体产生对骨骼肌肉和骨的有益合成代谢作用,和对脂肪组织的分解代谢作用,非常类似于ActRIIB-Fc 同二聚体。然而,不像ActRIIB同二聚体,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体仅显示对BMP9和BMP10的低亲和力或短暂结合,因此应

对由这些配体介导的过程例如血管发生具有很少至没有同时抑制。这种新的选择性可用于例如,治疗需要对肌肉和骨的刺激作用和对脂肪的抑制作用,但不需要改变血管发生的患者。

[0715] 实施例4. ALK4:ActRIIB异多聚体治疗抑制肾纤维化和炎症和减少肾损伤

[0716] 描述于实施例2的ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体对肾疾病的作用在小鼠单侧输尿管梗阻模型中进行评价。参见例如,Klahr和Morrissey (2002) *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F861-F875。

[0717] 24只12周龄的C57BL/6雄性小鼠在肾的低极的水平上经过左单侧输尿管结扎两次。3天后,8只小鼠被安乐死,和收获各个动物的肾以评价肾损伤。余下的小鼠被随机分为两组:i)在手术后第3天、第7天、第10天和第14天向8只小鼠皮下注射10mg/kg剂量的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体,和ii)在手术后第3天、第7天、第10天和第14天向8只小鼠皮下注射溶媒对照磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在第17天根据相关的动物管理指南处死两组动物。收集各个动物的半肾用于组织学分析(H&E和马松三色染色),来自UUO肾和对侧肾二者,和1/4肾用于RNA提取(RNeasy Midi Kit, Qiagen, IL)。

[0718] 进行对UUO肾样品的基因表达分析以评价各种基因水平。在 CFX Connect™ Real-time PCR检测系统(Bio-Rad, CA)上进行 QRT-PCR以评价各种纤维化基因(Coll1a1、纤连蛋白、PAI-1、CTGF 和 α -SMA)、炎性基因(TNF α 和MCP1)、细胞因子(TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3和活化素A)和肾损伤基因(NGAL)的表达。参见图14。用 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体治疗小鼠显著抑制纤维化和炎性基因的表达,抑制TGF β 1/2/3的上调和减少肾损伤。组织学数据证实了在 UUO模型中ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体治疗显著抑制肾纤维化和减少肾损伤。

[0719] 总之,这些数据证实ALK4:ActRIIB异多聚体治疗抑制肾纤维化和炎症和减少肾损伤。此外,这些数据表明其它ALK4:ActRIIB拮抗剂可用于治疗或预防肾疾病,包括例如,ALK4和/或ActRIIB-结合配体的拮抗剂、ALK4和/或ActRIIB受体的拮抗剂、ALK4和/或ActRIIB 下游信号传导介质(例如,Smads)的拮抗剂和与ALK4和/或ActRIIB 有关的TGF β 超家族共受体的拮抗剂。

序列表

<110> 阿塞勒隆制药公司

<120> ALK4:ActRIIB 异多聚体和其用途

<130> PHPH-080-W02

<140> PCT/US2016/026269

<141> 2016-04-06

<150> 62/220, 836

<151> 2015-09-18

<150> 62/143, 579

<151> 2015-04-06

<160> 96

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001]

```

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

```

[0002]

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240
 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255
 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510
 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser

35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110
 Ala Pro Thr
 115
 <210> 3
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala
 100
 <210> 4
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn

[0004]

85	90	95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg		
100	105	110
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro		
115	120	125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu		
130	135	140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr		
145	150	155
Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro		
165	170	175
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu		
180	185	190
Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln		
195	200	205
Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys		
210	215	220
Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys		
225	230	235
His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn		
245	250	255
Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser		
260	265	270
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys		
275	280	285
His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp		
290	295	300
Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg		
305	310	315
Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val		
325	330	335
Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro		
340	345	350
Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu		
355	360	365
Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile		
370	375	380
Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys		
385	390	395
Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu		
405	410	415
Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val		
420	425	430
His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro		
435	440	445
Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp		

[0005]

450					455					460					
Ala	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Ala	Gly	Cys	Val	Glu	Glu	Arg	Val	Ser	Leu
465					470					475					480
Ile	Arg	Arg	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Ser	Leu
485					490					495					
Val	Thr	Ser	Val	Thr	Asn	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Ile
500					505					510					
<210> 5															
<211> 115															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 5															
Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn
1				5				10				15			
Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly
20				25				30							
Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser
35				40				45							
Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn
50				55				60							
Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val
65				70				75				80			
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His
85				90				95							
Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr
100				105				110							
Ala Pro Thr															
115															
<210> 6															
<211> 100															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 6															
Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn
1				5				10				15			
Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly
20				25				30							
Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser
35				40				45							
Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn
50				55				60							
Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val
65				70				75				80			
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His
85				90				95							
Leu Pro Glu Ala															

100

<210> 7

<211> 1536

<212> DNA

<213> 智人

<400> 7

[0006]

```

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtgcgc cggctctggg      60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc      120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac      180
gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat      240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggtgtac      300
ttctgtgct gtgaaggcaa ctctgcaac gaacgcttca ctcatgtgcc agaggctggg      360
ggccccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccc cctgtctcac ggtgtctggc      420
tactcactgc tgcccatcgg ggccctttcc ctcatcgtcc tctgtgccct ttggatgtac      480
cggcatcgca agcccccta cggtcattgt gacatccatg aggaccttgg gcctccacca      540
ccatccctc tggtgggctt gaagccactg cagctgtctg agatcaaggc tcgggggcgc      600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca      660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag      720
cacgagaacc tgctacagtt cattgtctgc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag      780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac      840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac      900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg      960
gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt     1020
ggcttggctg ttcatattga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc     1080
acgagacggg acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc     1140
ttcttcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgtgtg gggagcttgt gtctcgtgc     1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtag atgctgccct ttgaggaaga gattggccag     1260
cacccttctg tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt     1320
aaagatcaat ggttgaacaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc     1380
tgggaccatg atcgagaggc tcgcttgctc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg     1440
attcgagggt cgttcaacgg cactacctcg gactgtctcg ttccctggt gacctctgtc     1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatc     1536

```

<210> 8

<211> 345

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8

```

gggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag      60
cgcaccaacc agagcggcct ggagcgtgc gaagcgagc aggacaagcg gctgcactgc      120
tacgcctcct ggcgaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta      180
gatgacttca actgtacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa ccccagggtg      240
tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgaacgt tcactcattt gccagaggct      300
ggggggcccg aagtcacgta cgagccccc cgcacagccc ccacc      345

```

<210> 9

<211> 505

<212> PRT

<213> 智人
 <400> 9
 Met Ala Glu Ser Ala Gly Ala Ser Ser Phe Phe Pro Leu Val Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu
 20 25 30
 Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr
 35 40 45
 Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His
 50 55 60
 His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys
 65 70 75 80
 Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys
 85 90 95
 Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His
 100 105 110
 Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Leu Val
 115 120 125
 Gly Ile Ile Ala Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ile Ile
 130 135 140
 Val Phe Leu Val Ile Asn Tyr His Gln Arg Val Tyr His Asn Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Asp Met Glu Asp Pro Ser Cys Glu Met Cys Leu Ser Lys Asp
 [0007] 165 170 175
 Lys Thr Leu Gln Asp Leu Val Tyr Asp Leu Ser Thr Ser Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Leu Pro Leu Phe Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Thr Ile Val
 195 200 205
 Leu Gln Glu Ile Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly
 210 215 220
 Arg Trp Arg Gly Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu
 245 250 255
 Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn
 260 265 270
 Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly
 275 280 285
 Ser Leu Phe Asp Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Ile Glu Gly Met
 290 295 300
 Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ala Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met
 305 310 315 320
 Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu
 325 330 335
 Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Met Cys Ala Ile Ala
 340 345 350

[0008]

Asp Leu Gly Leu Ala Val Arg His Asp Ala Val Thr Asp Thr Ile Asp
 355 360 365
 Ile Ala Pro Asn Gln Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 370 375 380
 Val Leu Asp Glu Thr Ile Asn Met Lys His Phe Asp Ser Phe Lys Cys
 385 390 395 400
 Ala Asp Ile Tyr Ala Leu Gly Leu Val Tyr Trp Glu Ile Ala Arg Arg
 405 410 415
 Cys Asn Ser Gly Gly Val His Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp
 420 425 430
 Leu Val Pro Ser Asp Pro Ser Ile Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys
 435 440 445
 Asp Gln Lys Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Trp Trp Gln Ser Tyr Glu
 450 455 460
 Ala Leu Arg Val Met Gly Lys Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn
 465 470 475 480
 Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln
 485 490 495
 Leu Ser Val Gln Glu Asp Val Lys Ile
 500 505

<210> 10

<211> 103

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

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

<210> 11

<211> 1515

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

atggcggagt cgcccgagc ctctccttc tcccccttg ttgtctcct getcgcggc 60
 agcggcgggt cggggcccg ggggggtccag gctctgctgt gtgcgtgcac cagctgcctc 120

	caggccaact acacgtgtga gacagatggg gcctgcatgg tttccatttt caatctggat	180
	gggatggagc accatgtgcg cacctgcac cccaaagtgg agctgggtccc tgccgggaag	240
	cccttctact gcctgagctc ggaggacctg cgcaacaccc actgctgcta cactgactac	300
	tgcaacagga tcgacttgag ggtgccctg ggtcacctca aggagcctga gcacccgtcc	360
	atgtggggcc cgggtggagct ggtaggcatc atcgccggcc cgggtgttctt cctgttcttc	420
	atcatcatca ttgttttctt tgtcattaac tatcatcagc gtgtctatca caaccgccag	480
	agactggaca tggaagatcc ctcatgtgag atgtgtctct ccaaagacaa gacgtctcag	540
	gatcttgtct acgatctctc cacctcaggg tctggctcag ggttaccctt ctttgtccag	600
	cgcacagtgg cccgaacat cgtttttacaa gagattattg gcaagggtcg gtttggggaa	660
	gtatggcggg gccgctggag ggggtggtgat gtggctgtga aaatattctc ttctcgtgaa	720
	gaacggtctt gggtcaggga agcagagata taccagacgg tcatgctgcg ccatgaaaac	780
	atccttggat ttattgtctc tgacaataaa gataatggca cctggacaca gctgtggctt	840
	gtttctgact atcatgagca cgggtccctg ttgtattatc tgaaccggtg cacagtgcac	900
	attgagggga tgattaagct ggccttgtct gctgctagtg ggctggcaca cctgcacatg	960
	gagatcgtgg gcaccaagga gaagcctgga atgtctcacc gagacttaaa gtcaaagaac	1020
	attctggtga agaaaaatgg catgtgtgcc atagcagacc tgggcctggc tgtccgtcat	1080
	gatgcagtca ctgacacat tgacattgcc ccgaatcaga ggggtggggac caaacgatac	1140
	atggcccttg aagtacttga tgaaccatt aatatgaaac actttgactc ctttaaatgt	1200
	gctgatattt atgccctcgg gcttgtatat tgggagattg ctgcaagatg caattctgga	1260
	ggagtccatg aagaatatca gctgccatat tacgacttag tgccctctga cccttccatt	1320
	gaggaaatgc gaaaggttgt atgtgatcag aagctgcgtc ccaacatccc caactggtgg	1380
	cagagttaag aggcactgcg ggtgatgggg aagatgatgc gagagtgttg gtatgccaac	1440
	ggcgcagccc gcctgacggc cctgcgcac cagaagaccc tctcccagct cagcgtgcag	1500
	gaagacgtga agatc	1515
	<210> 12	
	<211> 309	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 12	
	tccgggcccc ggggggtcca ggctctgctg tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac	60
	tacacgtgtg agacagatgg gccctgcatg gtttccattt tcaatctgga tgggatggag	120
	caccatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctggctc ctgccgggaa gcccttctac	180
	tgcttgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct acactgacta ctgcaacagg	240
	atcgacttga ggggtgccag tggtcacctc aaggagcctg agcaccgctc catgtggggc	300
	ccggtggag	309
	<210> 13	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成	
	肽	
	<400> 13	
	Gly Gly Gly	
	1	
	<210> 14	

[0010]

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
肽
<400> 14
Gly Gly Gly Gly
1
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
肽
<400> 15
Thr Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
肽
<400> 16
Ser Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
肽
<400> 17
Thr Gly Gly Gly
1
<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
肽

<400> 18
 Ser Gly Gly Gly
 1
 <210> 19
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 19
 Met Ala Glu Ser Ala Gly Ala Ser Ser Phe Phe Pro Leu Val Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu
 20 25 30
 Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr
 35 40 45
 Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His
 50 55 60
 His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys
 65 70 75 80
 Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys
 85 90 95
 Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His
 100 105 110
 [0011] Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Leu Val
 115 120 125
 Gly Ile Ile Ala Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ile Ile
 130 135 140
 Val Phe Leu Val Ile Asn Tyr His Gln Arg Val Tyr His Asn Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Asp Met Glu Asp Pro Ser Cys Glu Met Cys Leu Ser Lys Asp
 165 170 175
 Lys Thr Leu Gln Asp Leu Val Tyr Asp Leu Ser Thr Ser Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Leu Pro Leu Phe Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Thr Ile Val
 195 200 205
 Leu Gln Glu Ile Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly
 210 215 220
 Arg Trp Arg Gly Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu
 245 250 255
 Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Ala Asp
 260 265 270
 Cys Ser Phe Leu Thr Leu Pro Trp Glu Val Val Met Val Ser Ala Ala
 275 280 285
 Pro Lys Leu Arg Ser Leu Arg Leu Gln Tyr Lys Gly Gly Arg Gly Arg
 290 295 300

[0012]

Ala Arg Phe Leu Phe Pro Leu Asn Asn Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp
 305 310 315 320
 Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly Ser Leu Phe Asp Tyr Leu Asn
 325 330 335
 Arg Tyr Thr Val Thr Ile Glu Gly Met Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ala
 340 345 350
 Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly
 355 360 365
 Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val
 370 375 380
 Lys Lys Asn Gly Met Cys Ala Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Arg
 385 390 395 400
 His Asp Ala Val Thr Asp Thr Ile Asp Ile Ala Pro Asn Gln Arg Val
 405 410 415
 Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Thr Ile Asn
 420 425 430
 Met Lys His Phe Asp Ser Phe Lys Cys Ala Asp Ile Tyr Ala Leu Gly
 435 440 445
 Leu Val Tyr Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Asn Ser Gly Gly Val His
 450 455 460
 Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val Pro Ser Asp Pro Ser
 465 470 475 480
 Ile Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Asp Gln Lys Leu Arg Pro Asn
 485 490 495
 Ile Pro Asn Trp Trp Gln Ser Tyr Glu Ala Leu Arg Val Met Gly Lys
 500 505 510
 Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala
 515 520 525
 Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser Val Gln Glu Asp Val
 530 535 540
 Lys Ile
 545
 <210> 20
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 20
 Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
 20 25 30
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
 35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg

	65	70	75	80	
	Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro				
		85	90	95	
	Ser Met Trp Gly Pro Val Glu				
	100				
	<210> 21				
	<211> 1638				
	<212> DNA				
	<213> 智人				
	<400> 21				
	atggcgggagt cgcccgaggc ctctctcttc tcccccttg ttgtctctct gctcgccggc				60
	agcggcgggt ccgggccccg ggggggtccag gctctgctgt gtgcgtgcac cagctgcctc				120
	caggccaact acacgtgtga gacagatggg gcctgcatgg ttccatttt caatctggat				180
	gggatggagc accatgtgag caccctgcatc cccaaagtgg agctggctcc tgccgggaag				240
	cccttctact gcctgagctc ggaggacctg cgcaacaccc actgctgcta cactgactac				300
	tgcaacagga tcgacttgag ggtgcccagt ggtcacctca aggagcctga gcacccgtcc				360
	atgtggggcc cgggtgagct ggtaggcatc atcgccggcc cgggtgttct cctgttctc				420
	atcatcatca ttgttttct tgtcattaac tatcatcagc gtgtctatca caaccgccag				480
	agactggaca tggaagatcc ctcatgtgag atgtgtctct ccaaagacaa gacgtctcag				540
	gatcttgtct acgatctctc caccctcaggg tctggctcag ggttaccctt ctttgtccag				600
	cgcacagtgg cccgaacat cgttttacia gagattattg gcaagggtcg gtttggggaa				660
	gtatggcggg gccgctggag ggggtggtgat ttggctgtga aaatattctc ttctcgtgaa				720
	gaacgggtctt ggttcaggga agcagagata taccagacgg tcatgctgag ccatgaaaac				780
[0013]	atccttgat ttattgtgct tgacaataaa gcagactgct cattcctcac attgccatgg				840
	gaagtgttaa tggctctctg tcccccaag ctgaggagcc ttagactcca atacaaggga				900
	ggaaggggaa gagcaagatt ttatttccca ctgaataatg gcacctggac acagctgtgg				960
	cttgtttctg actatcatga gcacgggtcc ctgtttgatt atctgaaccg gtacacagtg				1020
	acaattgagg ggatgattaa gctggccttg tctgctgcta gtgggctggc acacctgcac				1080
	atggagatcg tgggcaccca agggaaacct ggaattgtct atcgagactt aaagtcaaag				1140
	aacattcttg tgaagaaaaa tggcatgtgt gccatagcag acctgggctt ggctgtccgt				1200
	catgatgcag tcaactgacac cattgacatt gccccgaatc agagggtggg gaccaaacga				1260
	tacatggccc ctgaagtact tgatgaaacc attaatatga aacactttga ctcttttaa				1320
	tgtgctgata ttatgtccct cgggcttgta tattgggaga ttgctcgaag atgcaattct				1380
	ggaggagtcc atgaagaata tcagctgcca tattacgact tagtgccctc tgacccttcc				1440
	attgaggaaa tgcgaaagg tgtatgtgat cagaagctgc gtcccaacat ccccaactgg				1500
	tggcagagtt ataggcact gcgggtgatg gggaagatga tgcgagagtg ttggtatgcc				1560
	aacggcgcag cccgcctgac ggccctgcgc atcaagaaga cctcttccca gctcagcgtg				1620
	caggaagacg tgaagatc				1638
	<210> 22				
	<211> 309				
	<212> DNA				
	<213> 智人				
	<400> 22				
	tccgggcccc ggggggtcca ggctctgctg ttgtgcgtga ccagctgcct ccaggccaac				60
	tacacgtgtg agacagatgg gcctgcatg gtttccattt tcaatctgga tgggatggag				120
	cacatgtgct gcacctgcat ccccaaagt gagctggctc ctgccggga gcccttctac				180

tgcctgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct acactgacta ctgcaacagg 240
 atcgacttga ggggtgcccgagg tggtcacctc aaggagcctg agcaccgcgc catgtggggc 300
 ccggtggag 309
 <210> 23
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成
 多肽
 <400> 23
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220
 Lys
 225
 <210> 24
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 人工序列的描述：合成
多肽

<400> 24

```

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

```

Lys

225

<210> 25

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
多肽

<400> 25

```

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

```

[0015]

[0016]

35	40	45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
50	55	60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
65	70	75
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
85	90	95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
100	105	110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
115	120	125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
145	150	155
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
165	170	175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
180	185	190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
195	200	205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
210	215	220

Lys

225

<210> 26

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 26

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

[0017]

```

          100          105          110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
          115          120          125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
          130          135          140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145          150          155          160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
          165          170          175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
          180          185          190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
          195          200          205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
          210          215          220
Lys
225
<210> 27
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成
      多肽
<400> 27
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1          5          10          15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
          20          25          30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
          35          40          45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
          50          55          60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65          70          75          80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
          85          90          95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
          100          105          110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
          115          120          125
Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
          130          135          140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145          150          155          160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

```

[0018]

	165	170	175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	180	185	190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	195	200	205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	210	215	220
Lys			
225			
<210> 28			
<211> 225			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成			
多肽			
<400> 28			
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
1	5	10	15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	20	25	30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	35	40	45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	50	55	60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
65	70	75	80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	85	90	95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	100	105	110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr			
	115	120	125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser			
	130	135	140
Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
145	150	155	160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	165	170	175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	180	185	190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	195	200	205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	210	215	220
Lys			

225
<210> 29
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
多肽
<400> 29
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
50 55 60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
100 105 110
[0019] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Phe Arg Pro Glu Val His Leu
115 120 125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140
Cys Leu Ala Arg Gly Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ser Arg Gln
165 170 175
Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Lys Leu Thr
180 185 190
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Thr Ile Ser Leu
210 215 220
Ser Pro Gly Lys
225
<210> 30
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
多肽

<400> 30
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu
 130 135 140
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 145 150 155 160
 Glu Ser Asn Gly Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala
 165 170 175
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Ile Leu Arg
 180 185 190
 Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Asp Arg
 210 215 220
 Ser Pro Gly Lys
 225
 <210> 31
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 31
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80

[0021]

```

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
      85                      90                      95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
      100                    105                    110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      115                    120                    125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      130                    135                    140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      145                    150                    155                    160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
      165                    170                    175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
      180                    185                    190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      195                    200                    205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      210                    215                    220
Lys
225
<210> 32
<211> 223
<212> PRT
<213> 智人
<400> 32
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
1          5          10          15
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
      20          25          30
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
      35          40          45
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
      50          55          60
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
      65          70          75          80
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
      85          90          95
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
      100         105         110
Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      115         120         125
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
      130         135         140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      145         150         155         160
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

```


165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 33
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 33
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 34
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
 50 55 60
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 65 70 75 80
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 85 90 95
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
 100 105 110
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 115 120 125
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 130 135 140
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 165 170 175
 [0023] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 180 185 190
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 195 200 205
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn
 210 215 220
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
 245 250 255
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 260 265 270
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275
 <210> 35
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

[0024]

```

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    35              40              45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50              55              60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
    65              70              75              80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
    85              90              95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
    100             105             110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    115             120             125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130             135             140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    145             150             155             160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
    165             170             175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
    180             185             190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    195             200             205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210             215             220
Leu Ser Leu Gly Lys
225
<210> 36
<211> 261
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成
      多肽
<400> 36
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1              5              10              15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
    20              25              30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
    35              40              45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    50              55              60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    65              70              75              80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
    85              90              95

```

```

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

```

[0025]

```

<210> 37
<211> 261
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成
      多肽
<400> 37
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1              5              10              15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
      20              25              30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
      35              40              45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
      50              55              60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
      65              70              75              80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
              85              90              95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
      100              105              110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      115              120              125

```

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220
 Lys Gly Gly Ser Ala Gln Leu Lys Lys Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys
 225 230 235 240
 Lys Asn Ala Gln Leu Lys Trp Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Leu
 245 250 255
 Ala Gln Gly Ala Thr
 260

<210> 38

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
肽

<400> 38

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro
 20

<210> 39

<211> 368

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
多肽

<400> 39

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

[0026]

[0027]

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80
 Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
 85 90 95
 Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110
 Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
 115 120 125
 Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
 130 135 140
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 145 150 155 160
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 165 170 175
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 180 185 190
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 195 200 205
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 210 215 220
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 225 230 235 240
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 245 250 255
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 275 280 285
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 290 295 300
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys
 305 310 315 320
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 340 345 350
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 40

<211> 1104

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

 <223> 人工序列的描述：合成
 多核苷酸

<400> 40

[0028]

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattta ctacaacgcc      120
aactggggagc tggagcgcac caaccagagc ggccctggagc gctgcgaagg cgagcaggac      180
aagcggctgc actgctacgc ctcttggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag      240
aagggtgctt ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag      300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact      360
catttgccag aggtctggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc      420
ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      480
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccttgaggtc      540
acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtactgt      600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      720
aagtcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc      780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc      840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctgaag      960
tccgacggtc cttcttctct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag     1080
agctctctcc tgtctccggg taaa                                           1104
<210> 41
<211> 343
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
      多肽
<400> 41
Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1             5             10             15
Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
      20             25             30
Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
      35             40             45
Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
      50             55             60
Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
      65             70             75             80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
      85             90             95
Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
      100            105            110
Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
      115            120            125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
      130            135            140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

```

145	150	155	160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
	165	170	175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
	180	185	190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	195	200	205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
	210	215	220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
225	230	235	240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys			
	245	250	255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	260	265	270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	275	280	285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	290	295	300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
305	310	315	320
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
	325	330	335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	340		
<210> 42			
<211> 355			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成			
多肽			
<400> 42			
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly			
1	5	10	15
Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala			
	20	25	30
Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu			
	35	40	45
Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu			
	50	55	60
His His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly			
65	70	75	80
Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys			
	85	90	95
Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly			

[0029]

	100	105	110
	His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr		
	115	120	125
	Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
	130	135	140
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	145	150	155
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	165	170	175
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	180	185	190
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
	195	200	205
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	210	215	220
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
	225	230	235
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	245	250	255
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
	260	265	270
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
	275	280	285
[0030]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro		
	290	295	300
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr		
	305	310	315
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	325	330	335
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	340	345	350
	Ser Pro Gly		
	355		
	<210> 43		
	<211> 1065		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列的描述: 合成		
	多核苷酸		
	<400> 43		
	atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt	60	
	tcgccccggcg cctccgggcc ccgggggggc caggetctgc tgtgtgctg caccagctgc	120	
	ctccaggcca actacacgtg tgagacagat ggggcctgca tggtttccat tttcaatctg	180	
	gatgggatgg agcaccatgt gcgcacctgc atccccaag tggagctggt ccctgccggg	240	
	aagcccttct actgcctgag ctcggaggac ctgcgcaaca cccactgctg ctacactgac	300	

	tactgcaaca ggatcgactt gaggggtgccc agtgggtcacc tcaaggagcc tgagcacccg	360
	tccatgtggg gcccgggtgga gaccgggtggt ggaactcaca catgcccacc gtgcccagca	420
	cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc	480
	atgatctccc ggacccttga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct	540
	gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg	600
	cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag	660
	gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc	720
	atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	780
	ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	840
	ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	900
	gacaccagc ctcccgctgt ggactccgac ggtctcttct tcctctatag cgacctcacc	960
	gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1020
	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggt	1065
	<210> 44	
	<211> 331	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成	
	多肽	
	<400> 44	
[0031]	Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys	
	1 5 10 15	
	Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser	
	20 25 30	
	Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro	
	35 40 45	
	Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser	
	50 55 60	
	Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg	
	65 70 75 80	
	Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro	
	85 90 95	
	Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro	
	100 105 110	
	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	
	115 120 125	
	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
	130 135 140	
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
	145 150 155 160	
	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
	165 170 175	
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
	180 185 190	
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	

	195	200	205
	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
	210	215	220
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
	225	230	235
	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
	245	250	255
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
	260	265	270
	Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
	275	280	285
	Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
	290	295	300
	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
	305	310	315
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	325	330	
	<210> 45		
	<211> 368		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
[0032]	<223> 人工序列的描述: 合成		
	多肽		
	<400> 45		
	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly		
	1	5	10
	Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr		
	20	25	30
	Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn		
	35	40	45
	Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His		
	50	55	60
	Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys		
	65	70	75
	Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys		
	85	90	95
	Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly		
	100	105	110
	Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro		
	115	120	125
	Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr		
	130	135	140
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
	145	150	155
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		

165												170				175			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro				
180								185				190							
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala				
195						200				205									
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val				
210				215				220											
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr				
225					230				235				240						
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr				
245						250				255									
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu				
260				265				270											
Pro	Pro	Cys	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys				
275					280				285										
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser				
290				295				300											
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp				
305					310				315				320						
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser				
325						330				335									
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala				
340				345				350											
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
355				360				365											
<210> 46																			
<211> 343																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> 人工序列的描述: 合成																			
多肽																			
<400> 46																			
Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn				
1				5				10				15							
Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly				
20						25				30									
Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Ser				
35					40				45										
Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn				
50				55				60											
Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val				
65						70				75				80					
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His				
85						90				95									
Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr				

[0034]

100	105	110
Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
115	120	125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
130	135	140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
145	150	155
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
165	170	175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
180	185	190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
195	200	205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
210	215	220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
225	230	235
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys		
245	250	255
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
260	265	270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
275	280	285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
290	295	300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
305	310	315
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
325	330	335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
340		
<210> 47		
<211> 356		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 合成		
多肽		
<400> 47		
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly		
1	5	10
Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala		
20	25	30
Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu		
35	40	45
Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu		

138

<400> 48
 Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
 20 25 30
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
 35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg
 65 70 75 80
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro
 85 90 95
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 115 120 125
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 130 135 140
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 145 150 155 160
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 165 170 175
 [0036] Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 180 185 190
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 195 200 205
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 210 215 220
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 225 230 235 240
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
 245 250 255
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 260 265 270
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 275 280 285
 Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 290 295 300
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 305 310 315 320
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 49
 <211> 116
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 49

```

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

```

<210> 50

<211> 150

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 50

[0037]

```

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1           5           10           15
Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
           20           25           30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
           35           40           45
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro
           50           55           60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65           70           75           80
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
           85           90           95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
           100          105          110
Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
           115          120          125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
           130          135          140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145           150
<210> 51
<211> 150
<212> PRT

```


<213> Sus sp.

<400> 51

```

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

```

[0038]

<210> 52

<211> 150

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 52

```

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

```

145 150
 <210> 53
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 53
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150
 <210> 54
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Bos sp.
 <400> 54
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro

[0039]

115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Val Gly Gly Leu Ser
 145 150
 <210> 55
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Xenopus sp.
 <400> 55
 Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe
 1 5 10 15
 Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
 35 40 45
 Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80
 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
 85 90 95
 [0040] Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn
 100 105 110
 Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro
 115 120 125
 Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro
 130 135 140
 Ile Val Gly Leu Ser Met
 145 150
 <210> 56
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 56
 Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
 20 25 30
 Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
 35 40 45
 Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
 65 70 75 80
 Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp

85 90 95
 Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
 100 105 110
 Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
 115 120 125
 Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
 130 135 140
 Val Pro Leu Met Leu Ile
 145 150
 <210> 57
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成
 共有序列
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Thr, Ala 或不存在
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (121)..(121)
 [0041] <223> Pro, Ala, Val 或 Met
 <400> 57
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 35 40 45
 Arg Leu Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80
 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu
 85 90 95
 Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn
 100 105 110
 Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 115 120 125
 Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
 130 135 140
 Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
 145 150
 <210> 58

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成
 肽
 <400> 58
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 59
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 59
 Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
 20 25 30
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
 35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg
 65 70 75 80
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro
 85 90 95
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu
 100
 <210> 60
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知的描述:
 Mole 多肽
 <400> 60
 Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Asn Leu Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
 20 25 30
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Leu Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
 35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Lys
 65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Val Lys Glu Pro Glu Arg Pro
 85 90 95
 Ser Val Trp Gly Pro Val Glu
 100
 <210> 61
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知的描述:
 Hedgehog 多肽
 <400> 61
 Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
 20 25 30
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
 35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Arg
 65 70 75 80
 [0043] Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Pro Lys Glu Ser Glu Gln Ala
 85 90 95
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu
 100
 <210> 62
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Gallus sp.
 <400> 62
 Ala Pro Gly Gly Ala Arg Ala Leu Thr Cys Leu Cys Ser Asp Cys Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Asn Ser Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Val
 20 25 30
 Phe Asn Leu Asp Gly Val Lys His His Val Arg Thr Cys Ile Pro Glu
 35 40 45
 Ala Lys Leu Ile Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu
 50 55 60
 Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Ser Asp Phe Cys Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Asp Leu Met Val Pro Ser Gly His Leu Lys Asp Asn Glu Pro Pro Ser
 85 90 95
 Ser Trp Gly Pro Val Glu
 100
 <210> 63

<211> 103
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 63
 Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
 20 25 30
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Val Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
 35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Ile Asp Phe Cys Asn Lys
 65 70 75 80
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Ala His Pro
 85 90 95
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu
 100

<210> 64

<211> 103

<212> PRT

<213> Sus sp.

<400> 64

[0044]

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

<210> 65

<211> 103

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 65

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

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
35 40 45
Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
50 55 60
Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Ile Asp Phe Cys Asn Lys
65 70 75 80
Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro
85 90 95
Ser Met Trp Gly Pro Val Glu
100

[0045]

<210> 66
<400> 66
000
<210> 67
<400> 67
000
<210> 68
<400> 68
000
<210> 69
<400> 69
000
<210> 70
<400> 70
000
<210> 71
<400> 71
000
<210> 72
<400> 72
000
<210> 73
<400> 73
000
<210> 74
<400> 74
000
<210> 75
<400> 75
000
<210> 76
<400> 76
000
<210> 77
<400> 77
000

[0046]

<210> 78
<400> 78
000
<210> 79
<400> 79
000
<210> 80
<400> 80
000
<210> 81
<400> 81
000
<210> 82
<400> 82
000
<210> 83
<400> 83
000
<210> 84
<400> 84
000
<210> 85
<400> 85
000
<210> 86
<400> 86
000
<210> 87
<400> 87
000
<210> 88
<400> 88
000
<210> 89
<400> 89
000
<210> 90
<211> 344
<212> PRT
<213> 智人
<400> 90

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

[0047]

35	40	45
Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser		
50	55	60
Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile		
65	70	75
Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu		
85	90	95
Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn		
100	105	110
Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys		
115	120	125
Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala		
130	135	140
Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr		
145	150	155
Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser		
165	170	175
Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys		
180	185	190
Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly		
195	200	205
Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr		
210	215	220
Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile		
225	230	235
Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys		
245	250	255
Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu		
260	265	270
Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn		
275	280	285
Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser		
290	295	300
Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser		
305	310	315
Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe		
325	330	335
Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp		
340		
<210> 91		
<211> 317		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 91		
Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu		
1	5	10
		15

[0048]

```

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
    20                      25                      30
Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
    35                      40                      45
Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
    50                      55                      60
Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
    65                      70                      75                      80
Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
    85                      90                      95
Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
   100                      105                      110
Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
   115                      120                      125
Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
   130                      135                      140
Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
   145                      150                      155                      160
Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
   165                      170                      175
Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
   180                      185                      190
Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
   195                      200                      205
Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
   210                      215                      220
Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
   225                      230                      235                      240
Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
   245                      250                      255
Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
   260                      265                      270
Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
   275                      280                      285
Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
   290                      295                      300
Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
   305                      310                      315
<210> 92
<211> 63
<212> PRT
<213> 智人
<400> 92
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1                      5                      10                      15
Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

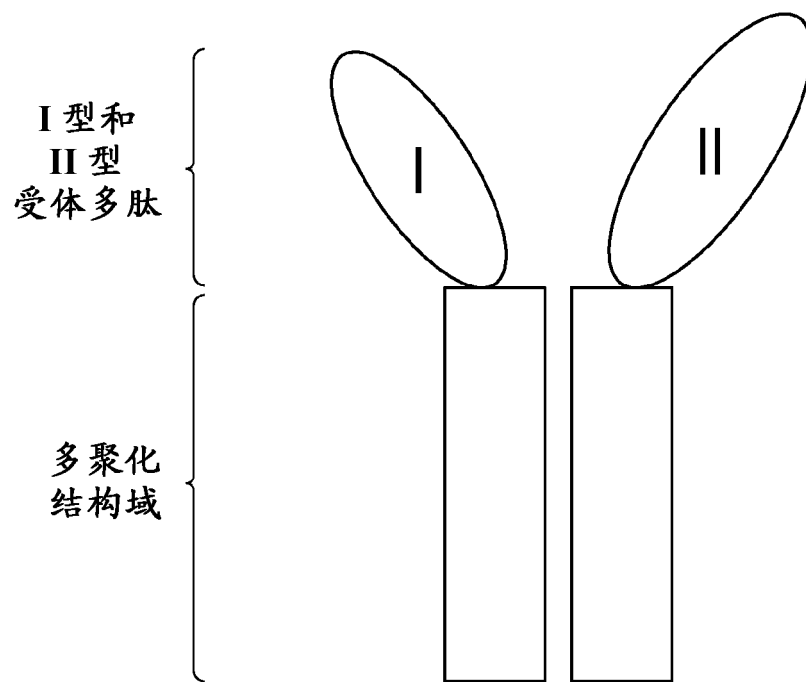
```

[0049]

Glu Cys Glu Leu Arg Ala Ala Arg Cys Arg Gly His Pro Asp Leu Ser
145 150 155 160
Val Met Tyr Arg Gly Arg Cys Arg Lys Ser Cys Glu His Val Val Cys
165 170 175
Pro Arg Pro Gln Ser Cys Val Val Asp Gln Thr Gly Ser Ala His Cys
180 185 190
Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Pro Val Pro Ser Ser Pro Gly Gln
195 200 205
Glu Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Met
210 215 220
Arg Gln Ala Thr Cys Phe Leu Gly Arg Ser Ile Gly Val Arg His Ala
225 230 235 240
[0050] Gly Ser Cys Ala Gly Thr Pro Glu Glu Pro Pro Gly Gly Glu Ser Ala
245 250 255
Glu Glu Glu Glu Asn Phe Val
260
<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成
6xHis 标签
<400> 96
His His His His His His
1 5

A

异二聚体复合物



B

异四聚体复合物

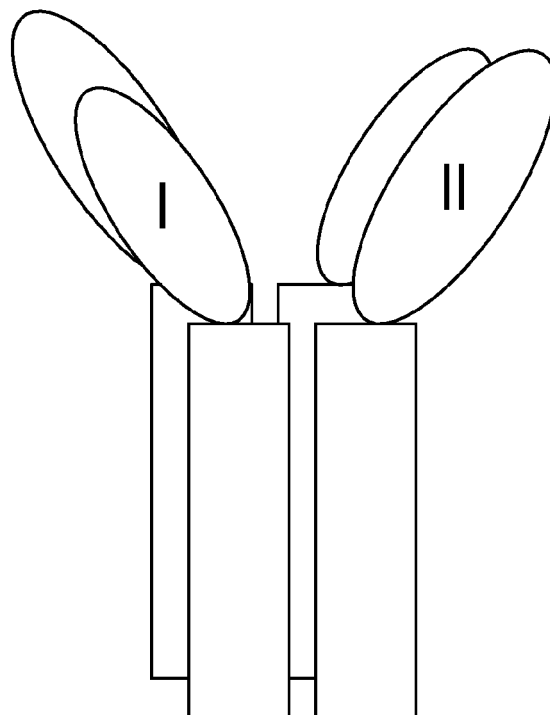


图 1

示意性的异聚蛋白复合物

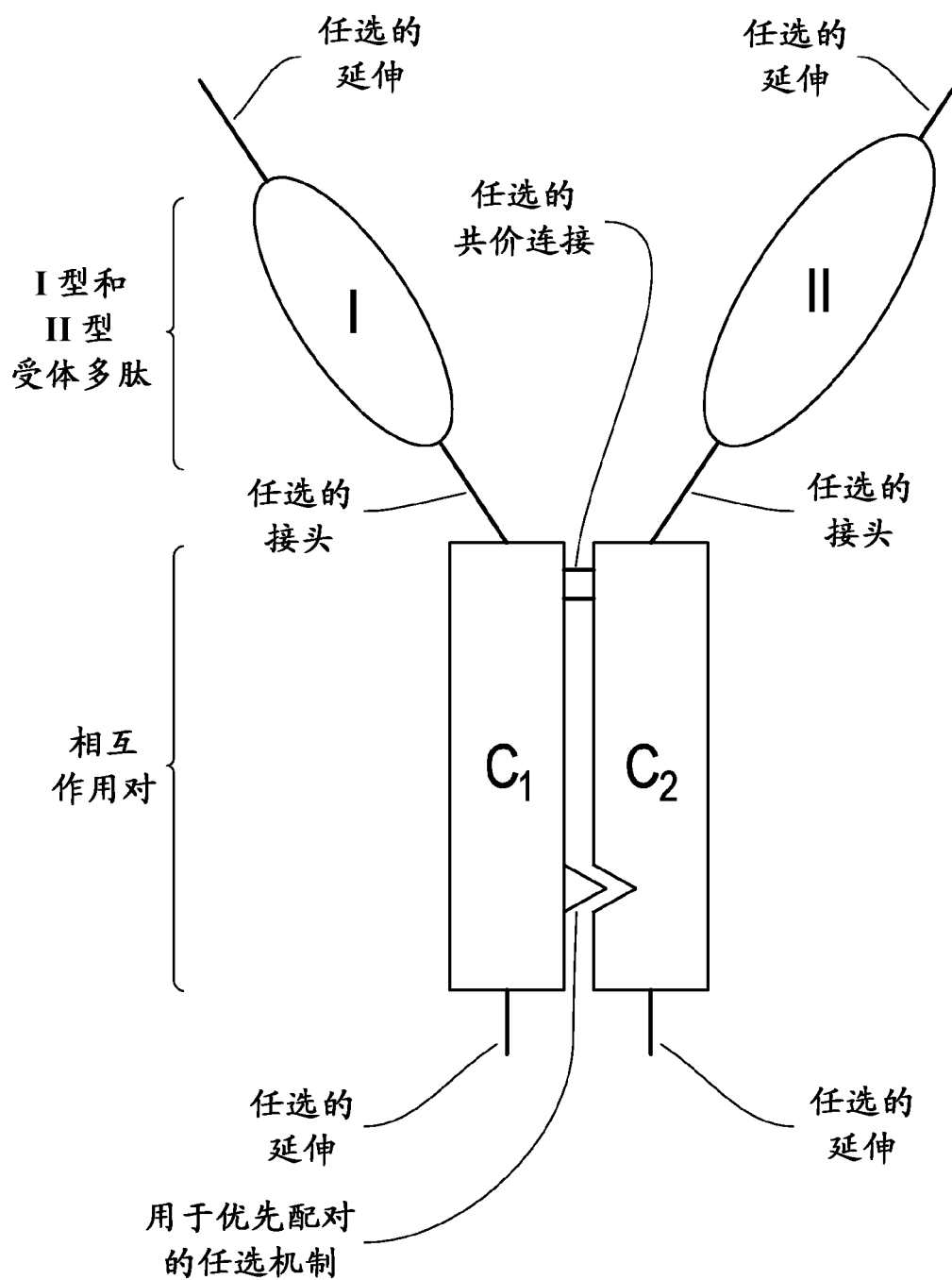


图 2

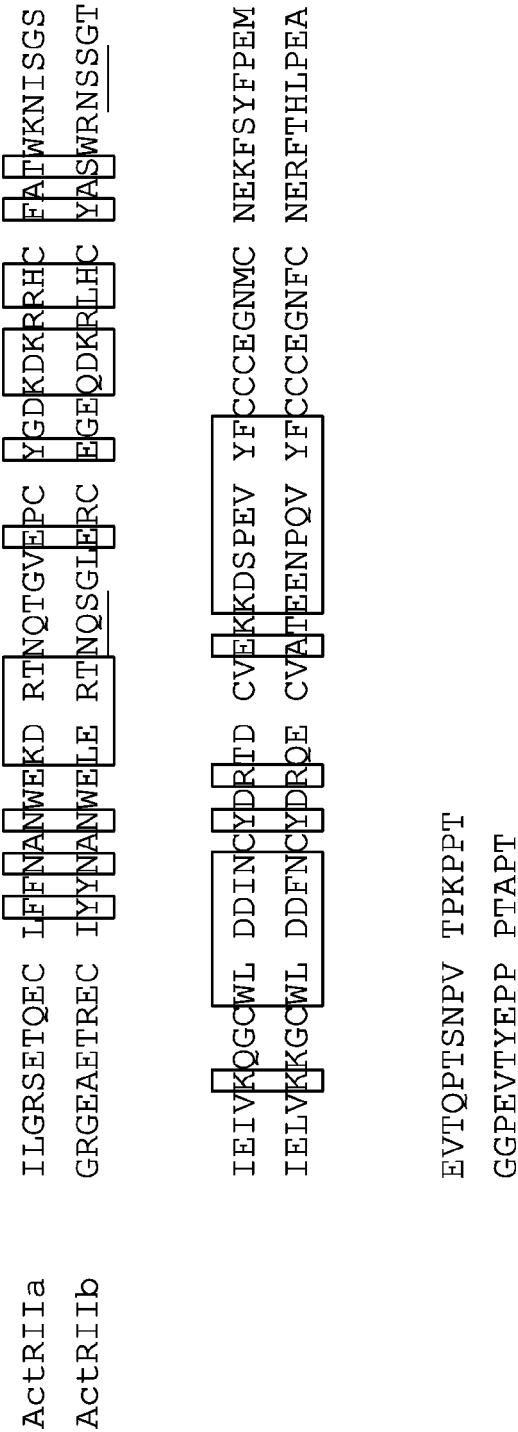


图 3

大鼠 IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	Y	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
猪 IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	L	W	G	S	L	C	V	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	Y	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
小鼠 IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	Y	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
人 IIb	M	T	A	P	W	V	A	-	L	A	L	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	Y	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
牛 IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	Y	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
非洲蟾蜍 IIb	M	G	A	S	V	A	L	T	F	L	L	L	A	T	F	R	A	G	S	G	H	D	E	V	E	T	R	E	C	I	Y	Y	N	A	N	W	E	L	E	K	T	N	Q	S	G	V	E	R	L	V	E	G	K	K	D	K	R	
人 IIA	M	G	A	A	K	L	A	F	A	V	F	L	I	S	C	S	S	G	A	I	L	G	R	S	E	T	Q	E	C	L	F	F	N	A	N	W	E	K	D	R	T	N	Q	T	G	V	E	P	-	C	Y	G	D	K	D	K	R	
共有序列	M	t	A	p	w	a	a	X	I	a	I	I	w	g	s	I	c	a	G	s	g	r	g	e	a	E	T	r	E	C	r	y	y	N	A	N	W	E	I	e	r	T	N	Q	s	G	I	E	r	L	c	e	G	e	q	D	K	R

大鼠 IIb	L	H	C	Y	A	S	W	P	N	S	S	G	T	I	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
猪 IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	I	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
小鼠 IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	I	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
人 IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	I	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
牛 IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	I	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
非洲蟾蜍 IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	G	F	I	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	I	A	K	E	E	N	P	Q	V	F	F	C	C	E	G	N	Y	C	N	K	K	F	T		
人 IIA	R	H	C	F	A	T	W	K	N	I	S	G	S	I	E	I	V	K	Q	G	C	W	L	D	D	I	N	C	Y	D	R	T	D	C	V	E	K	K	D	S	P	E	V	Y	F	C	C	E	G	N	M	C	N	E	K	F	S	
共有序列	I	H	C	y	A	s	w	r	n	s	s	g	t	i	e	l	v	k	k	g	c	w	l	d	d	f	n	c	y	d	r	q	e	c	v	a	t	e	e	n	p	q	v	y	f	c	c	c	e	g	n	f	c	n	e	r	f	t

大鼠 IIb	H	L	P	E	P	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-
猪 IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-
小鼠 IIb	H	L	P	E	P	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-
人 IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-
牛 IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-
非洲蟾蜍 IIb	H	L	P	E	V	-	-	-	E	T	F	D	P	K	P	Q	P	S	A	S	V	L	N	I	L	I	Y	S	L	L	P	I	V	G	L	S	M	
人 IIA	Y	F	P	E	M	E	V	T	Q	P	T	S	N	P	-	V	T	P	K	P	P	Y	Y	N	I	L	L	Y	S	L	V	P	L	M	L	I	-	-
共有序列	h	I	P	E	X	g	g	p	e	v	T	y	e	P	K	p	p	t	a	p	t	I	I	t	v	L	a	Y	S	L	I	P	i	g	I	S	M	

图 4

[illegible]

图 5

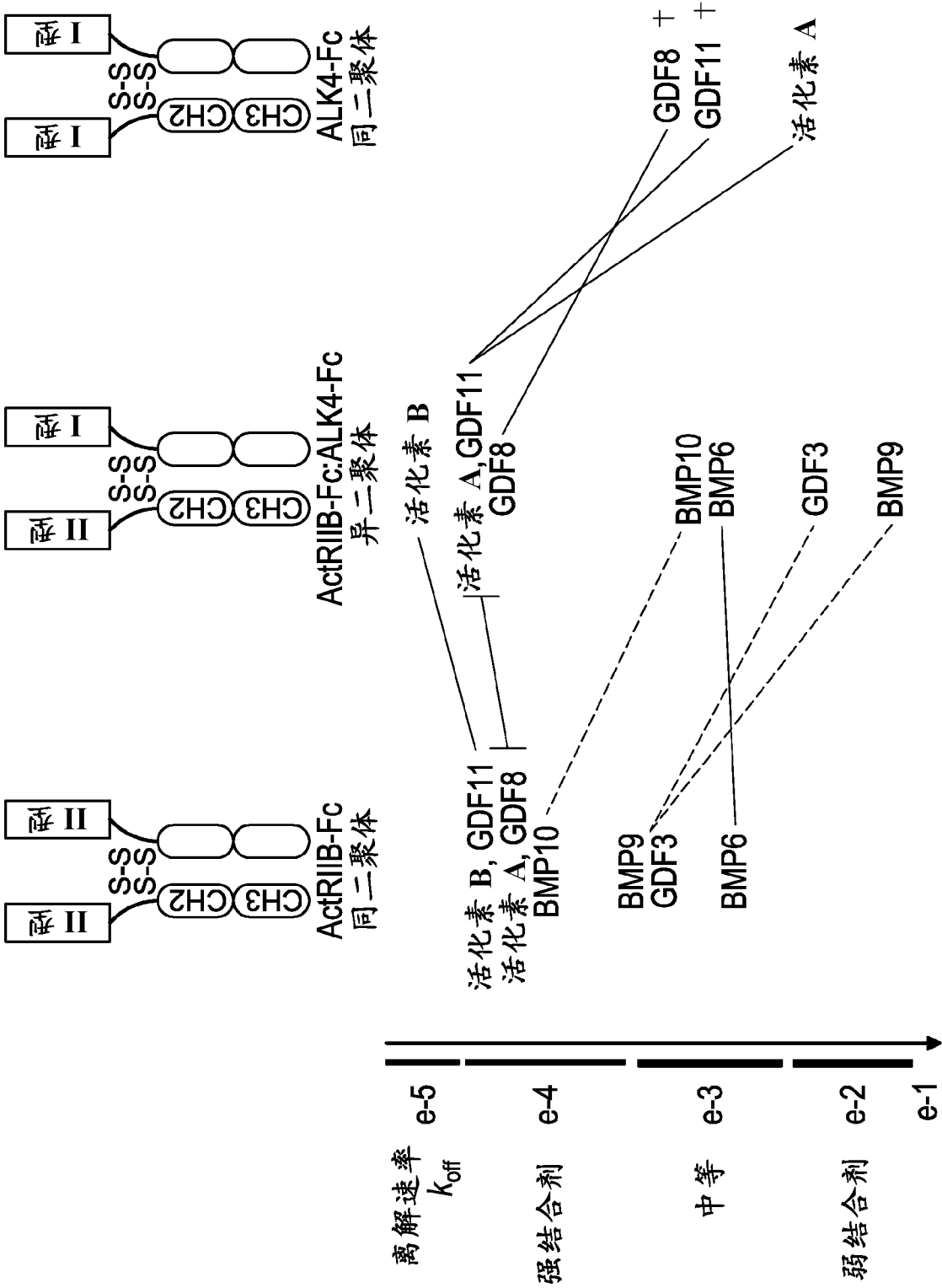


图 6

	10	20	30	40	50							
人	SGPRGV	QALLCACT	SCAQANYT	CETD	GACMV	SIFNLD	GMEHHV	RTCI	PKV			
鼯鼠	SGPRGI	QALLCACT	SCAQANLT	CETD	GACMV	SIFNLD	GLEHHV	RTCI	PKV			
刺狷	SGPRGI	QALLCACT	SCAQNTNYT	CETD	GACMV	SIFNLD	GMEHHV	RTCI	PKV			
鸡	-	APGGARAL	TCLCS	DKQANST	CETD	GACMV	SVFNLD	GVKHHV	RTCI	PEA		
小鼠	SGPRGI	QALLCACT	SCAQNTNYT	CETD	GACMV	SIFNLD	GVKHHV	RTCI	PKV			
猪	SGPRGI	QALLCACT	SCAQANYT	CETD	GACMV	SIFNLD	GMEHHV	RTCI	PKV			
Ras	SGPRGI	QALLCACT	SCAQNTNYT	CETD	GACMV	SIFNLD	GMEHHV	RTCI	PKV			
	60	70	80	90	100							
人	ELVP	AGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YTDY	CNRI	DLRV	PSGHL	KEPE	HP	SMWG
鼯鼠	ELVP	AGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YTDY	CNKI	DLRV	PSGHL	KEPE	HP	SMWG
刺狷	ELVP	AGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YTDY	CNRI	DLRV	PSGHL	KESE	QA	SMWG
鸡	KLI	PAGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YSDF	CNKI	DLMV	PSGHL	KDNE	PP	SMWG
小鼠	ELVP	AGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YI	DFCNKI	DLRV	PSGHL	KEPA	HP	SMWG
猪	ELVP	AGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YTDY	CNKI	DLRV	PSGHL	KEPE	HP	SMWG
Ras	ELVP	AGKPFY	CLSS	EDLR	NTHCC	YI	DFCNKI	DLRV	PSGHL	KEPE	HP	SMWG
	...	PVE										
人	PVE											
鼯鼠	PVE											
刺狷	PVE											
鸡	PVE											
小鼠	PVE											
猪	PVE											
Ras	PVE											

图 7

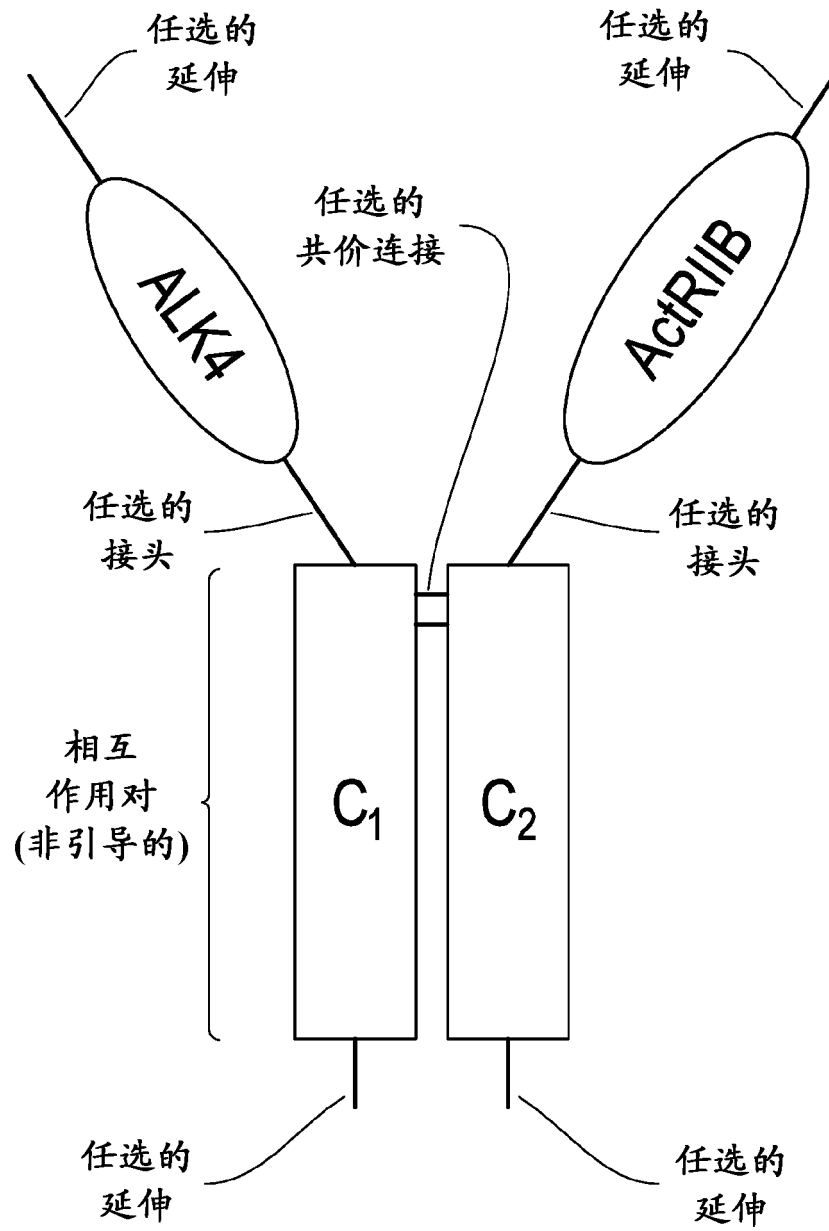


图 8A

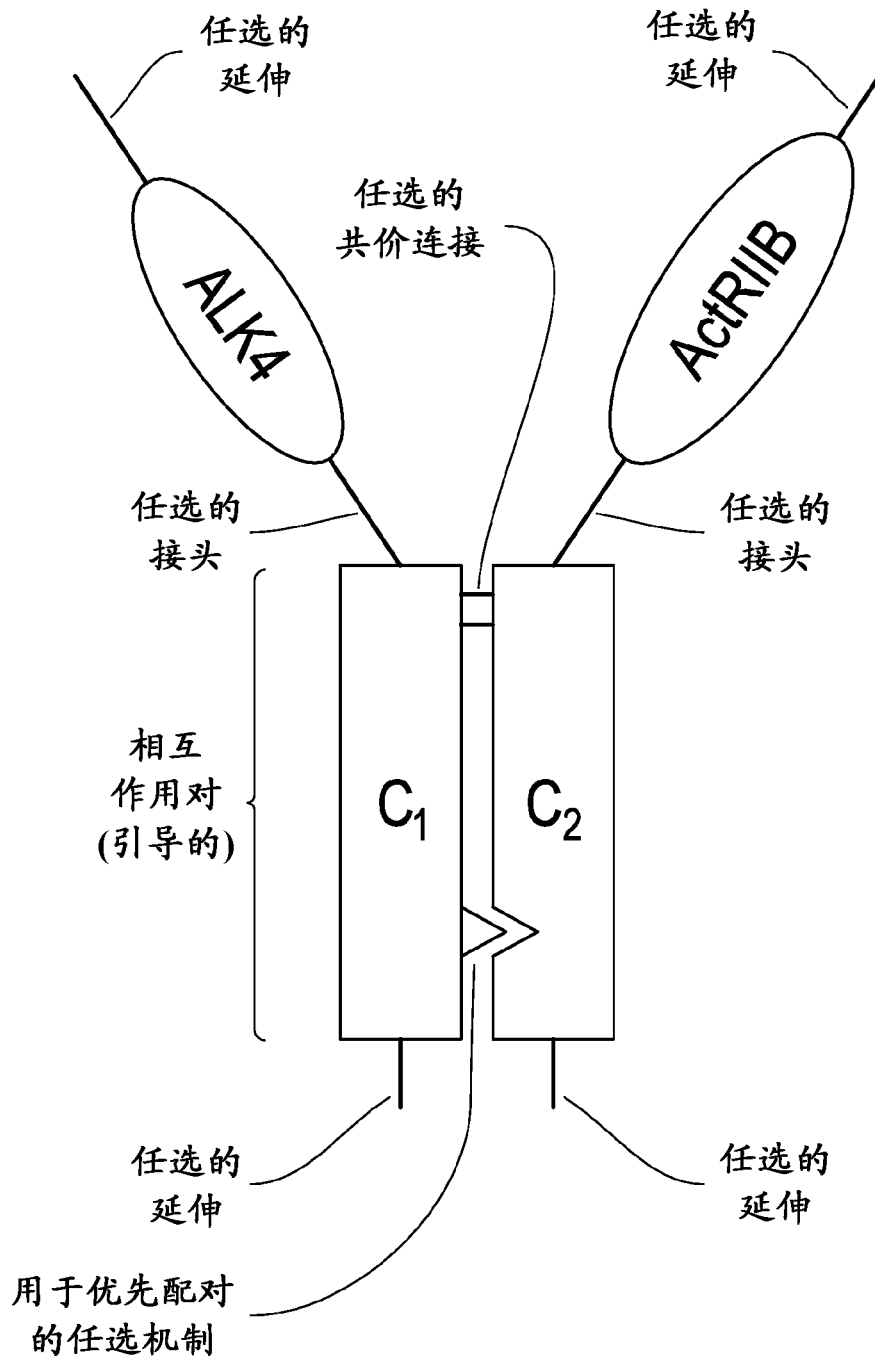


图 8B

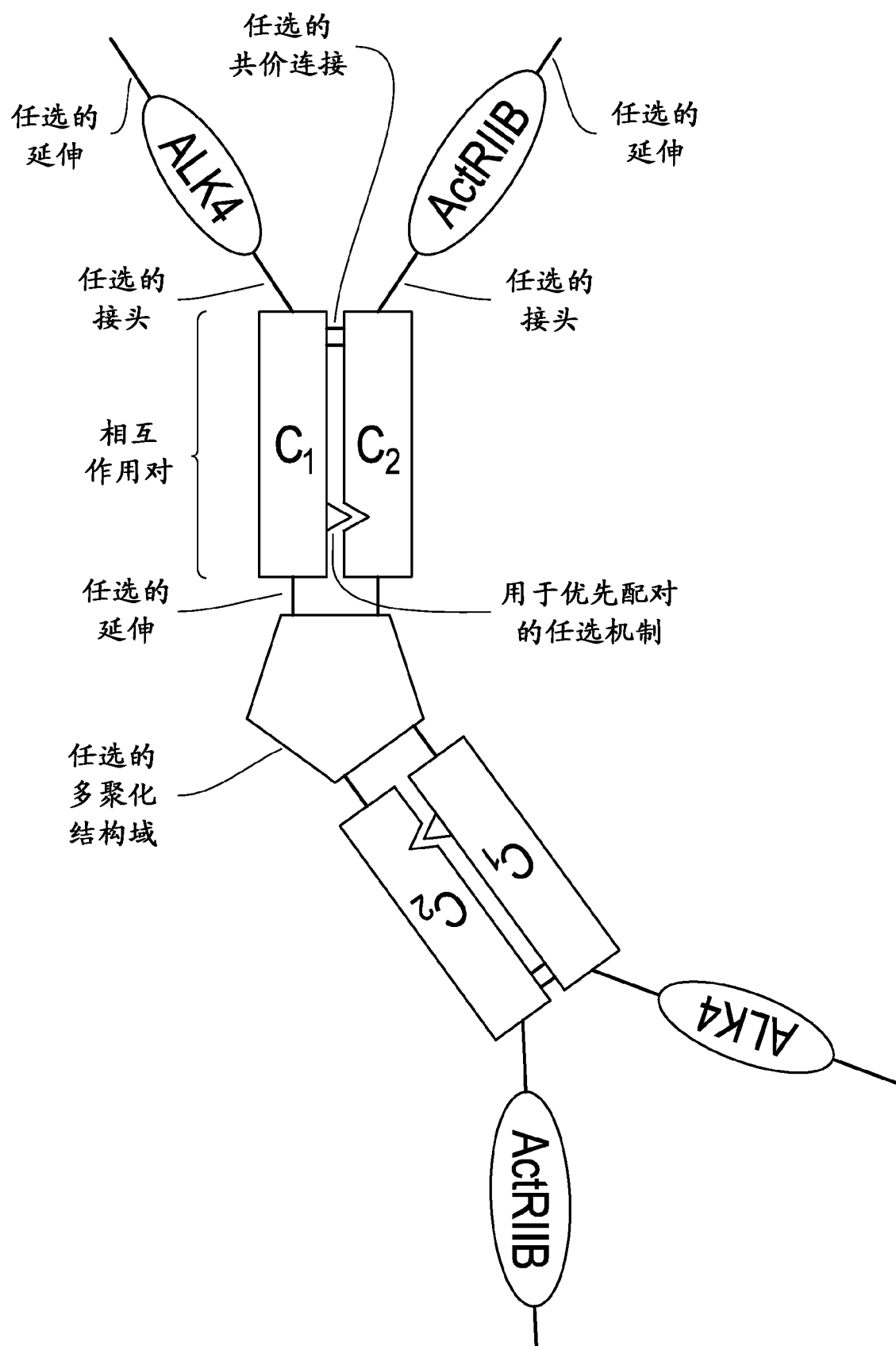


图 8C

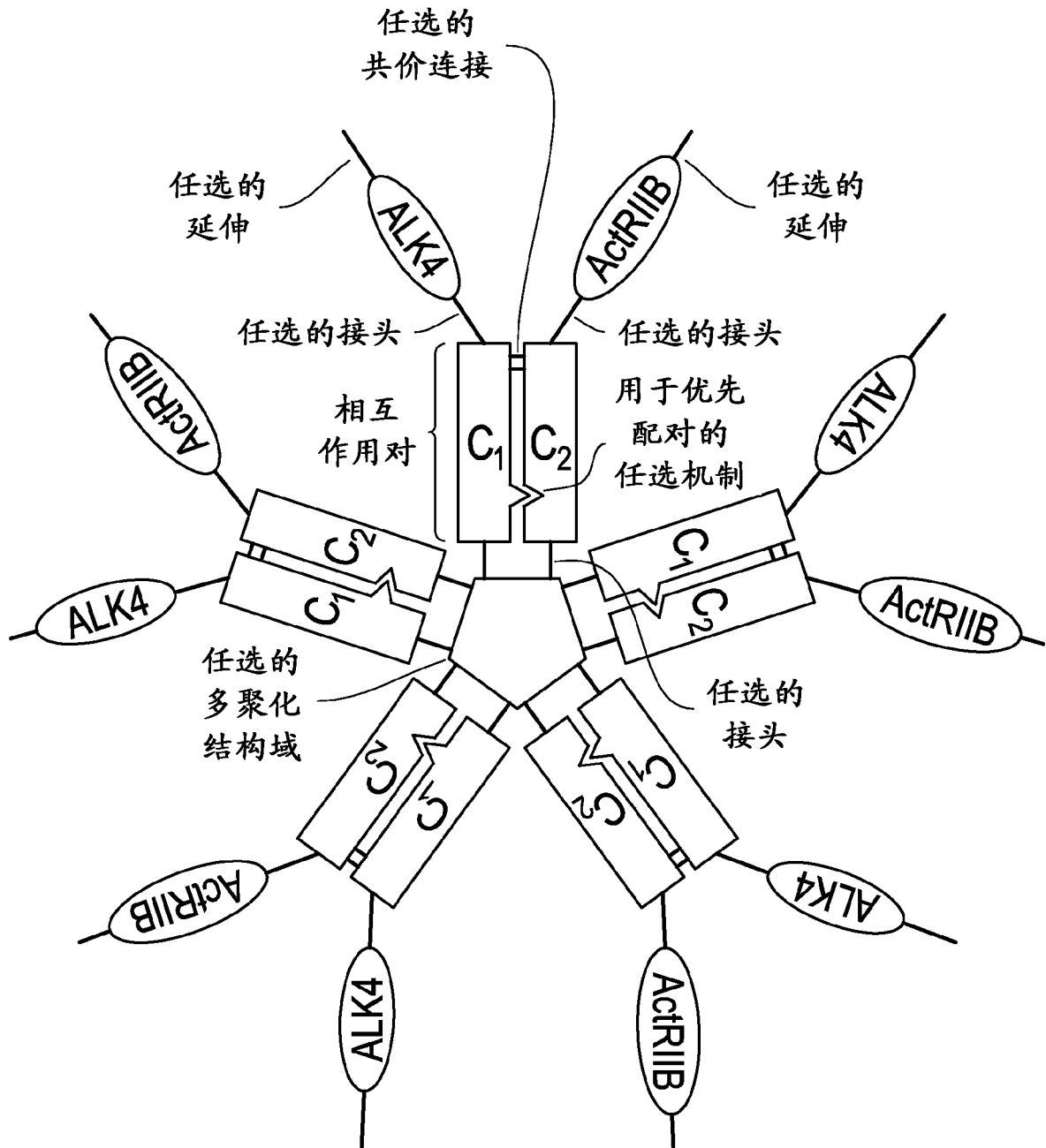


图 8D

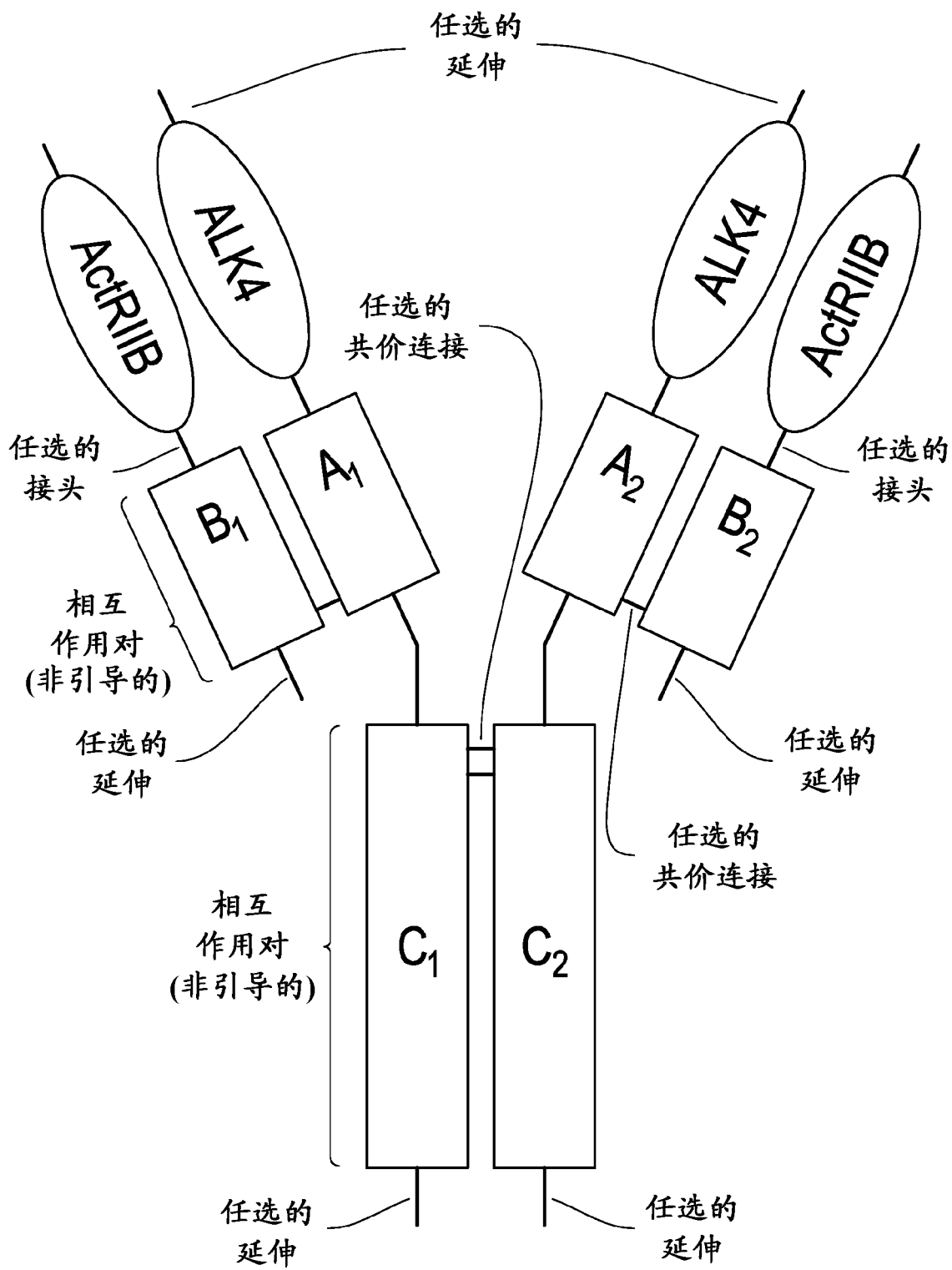


图 9A

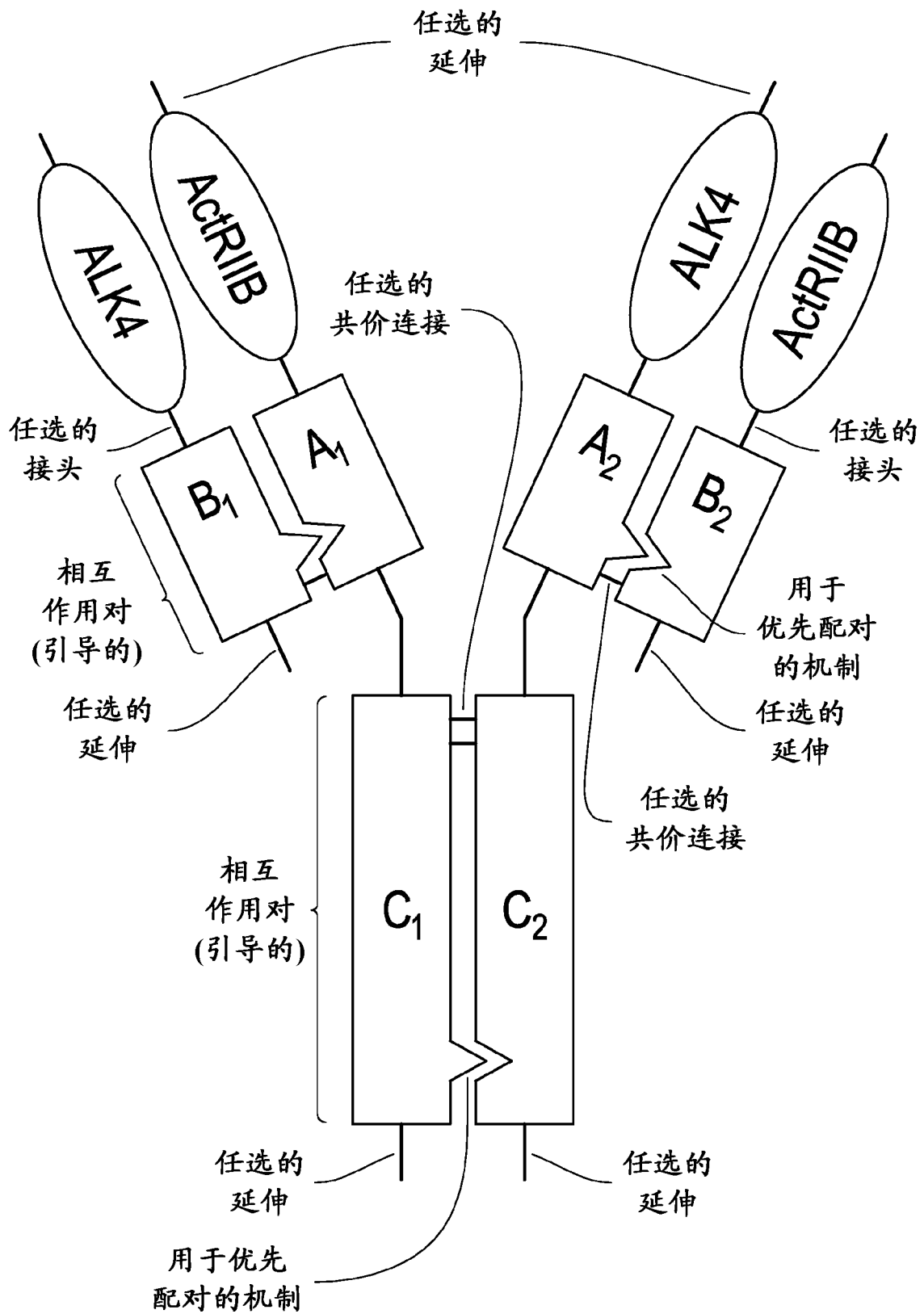


图 9B

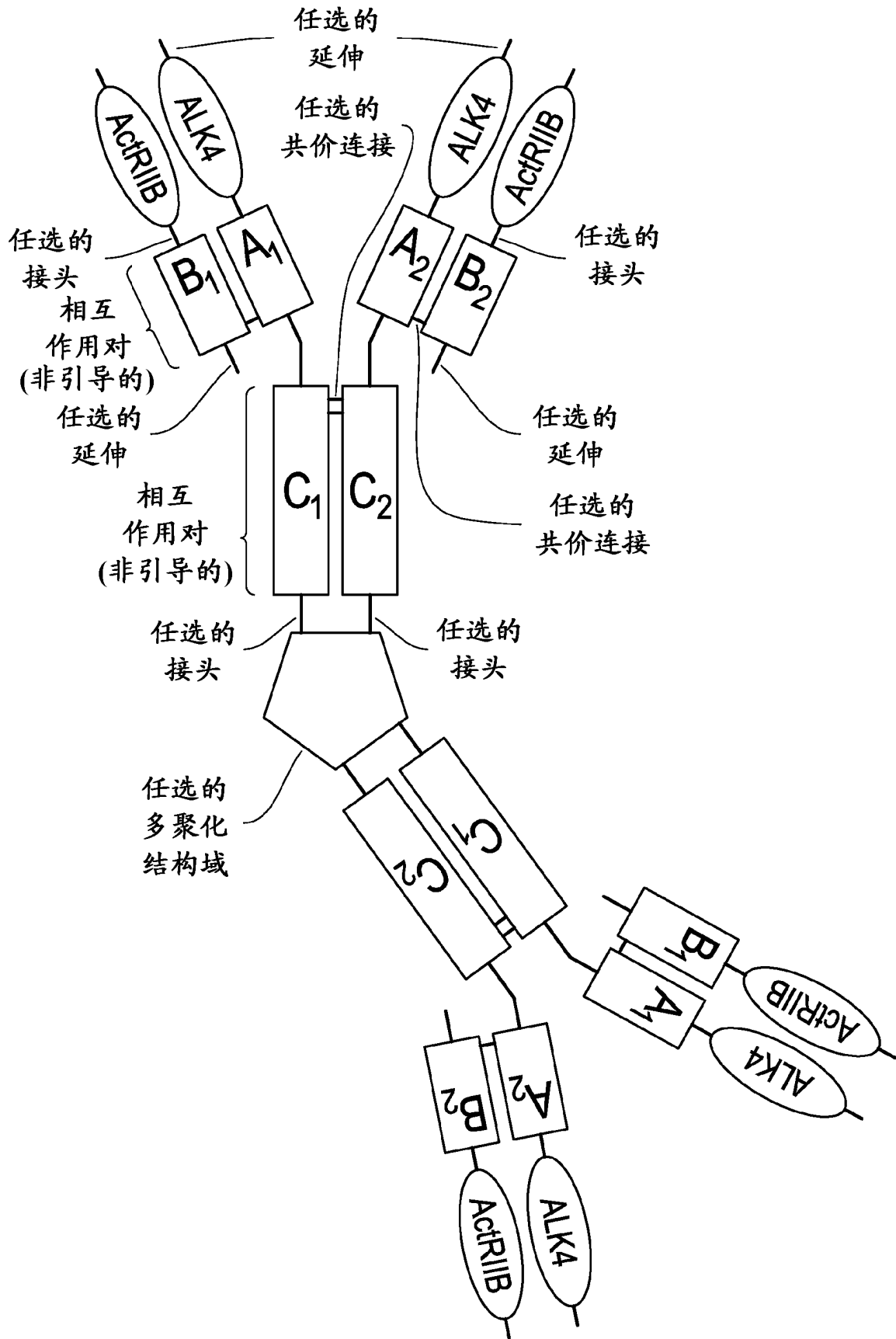


图 9C

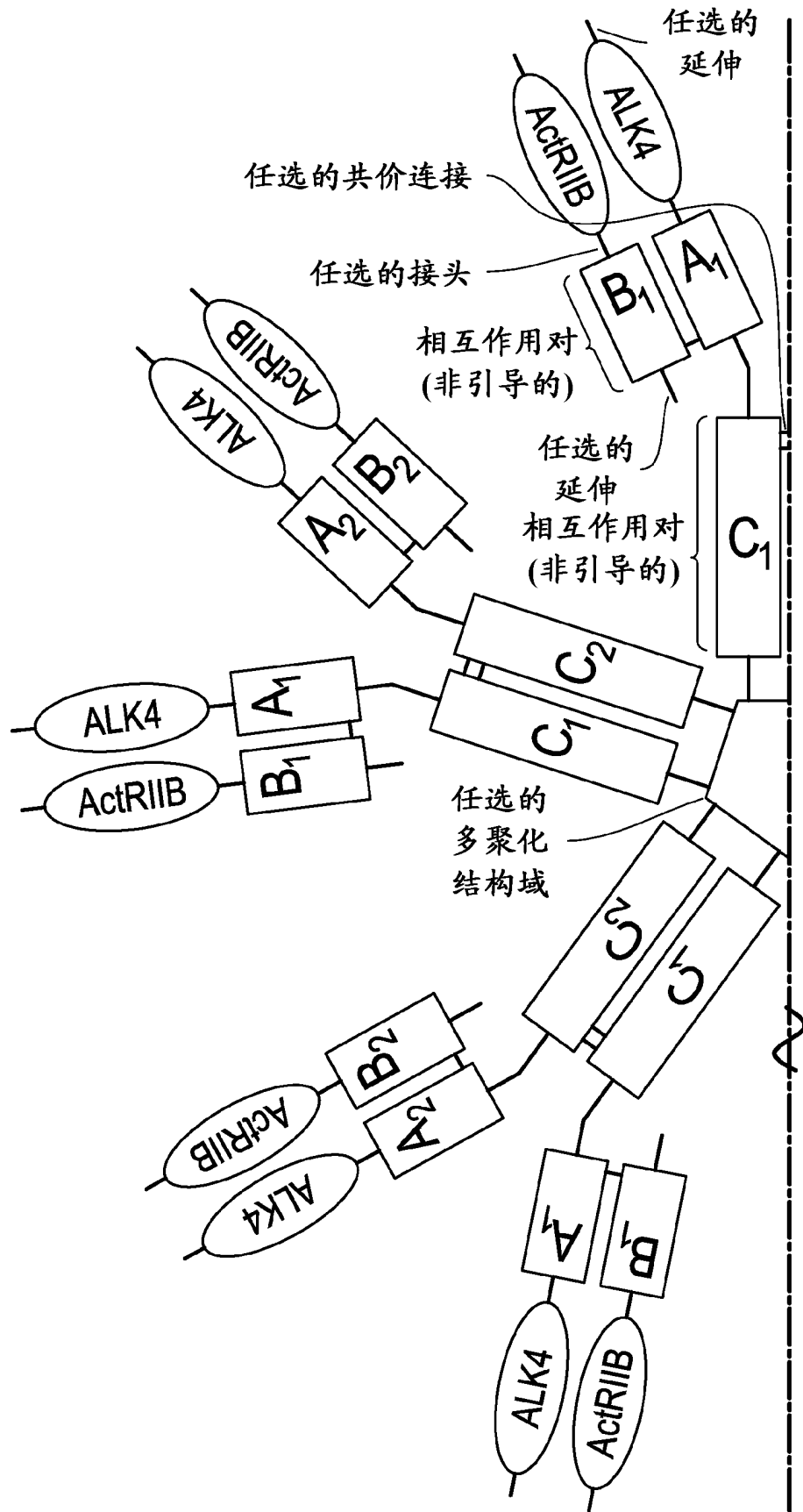


图 9D (部分1)

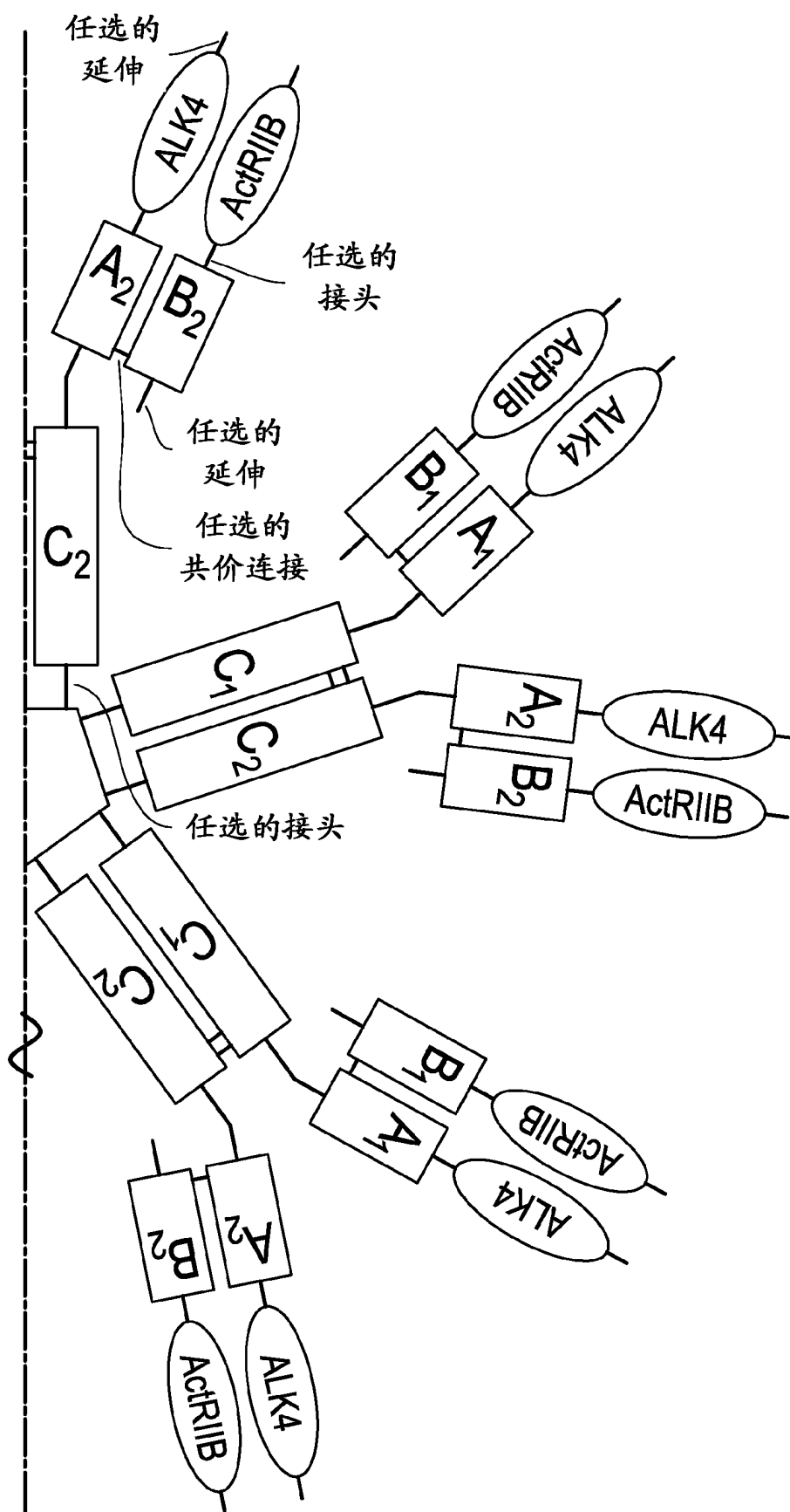


图 9D (部分2)

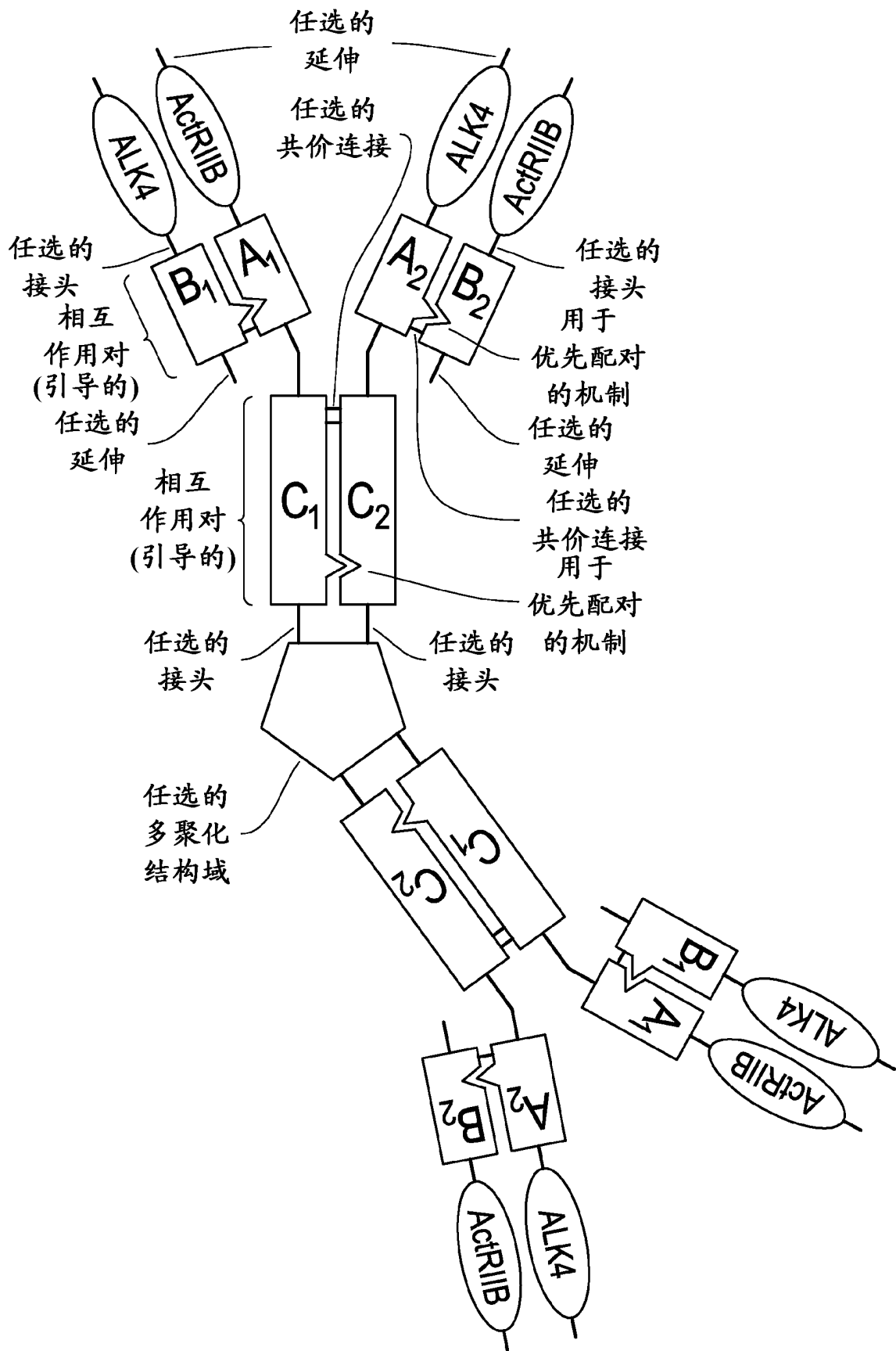


图 9E

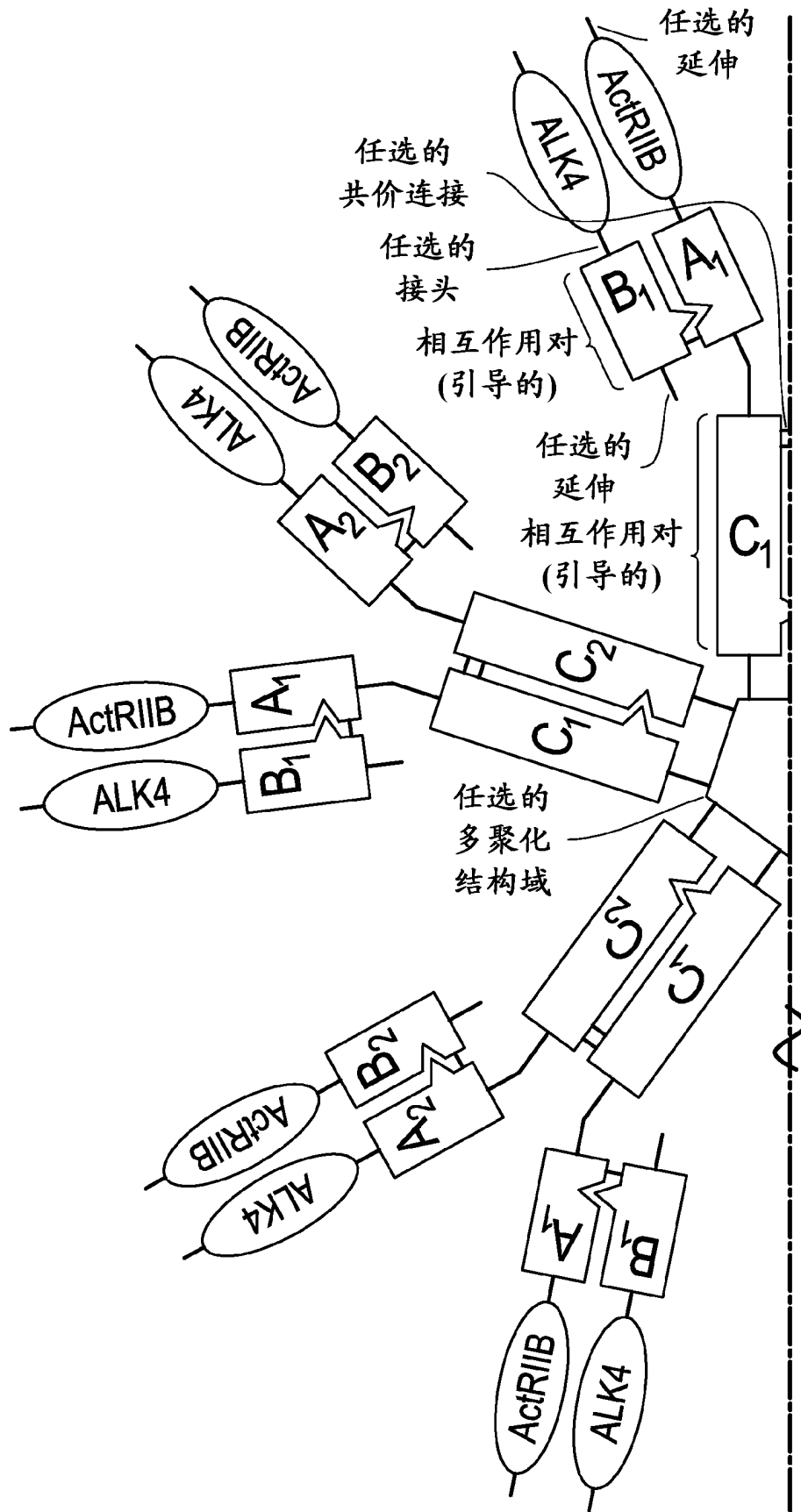


图 9F (部分1)

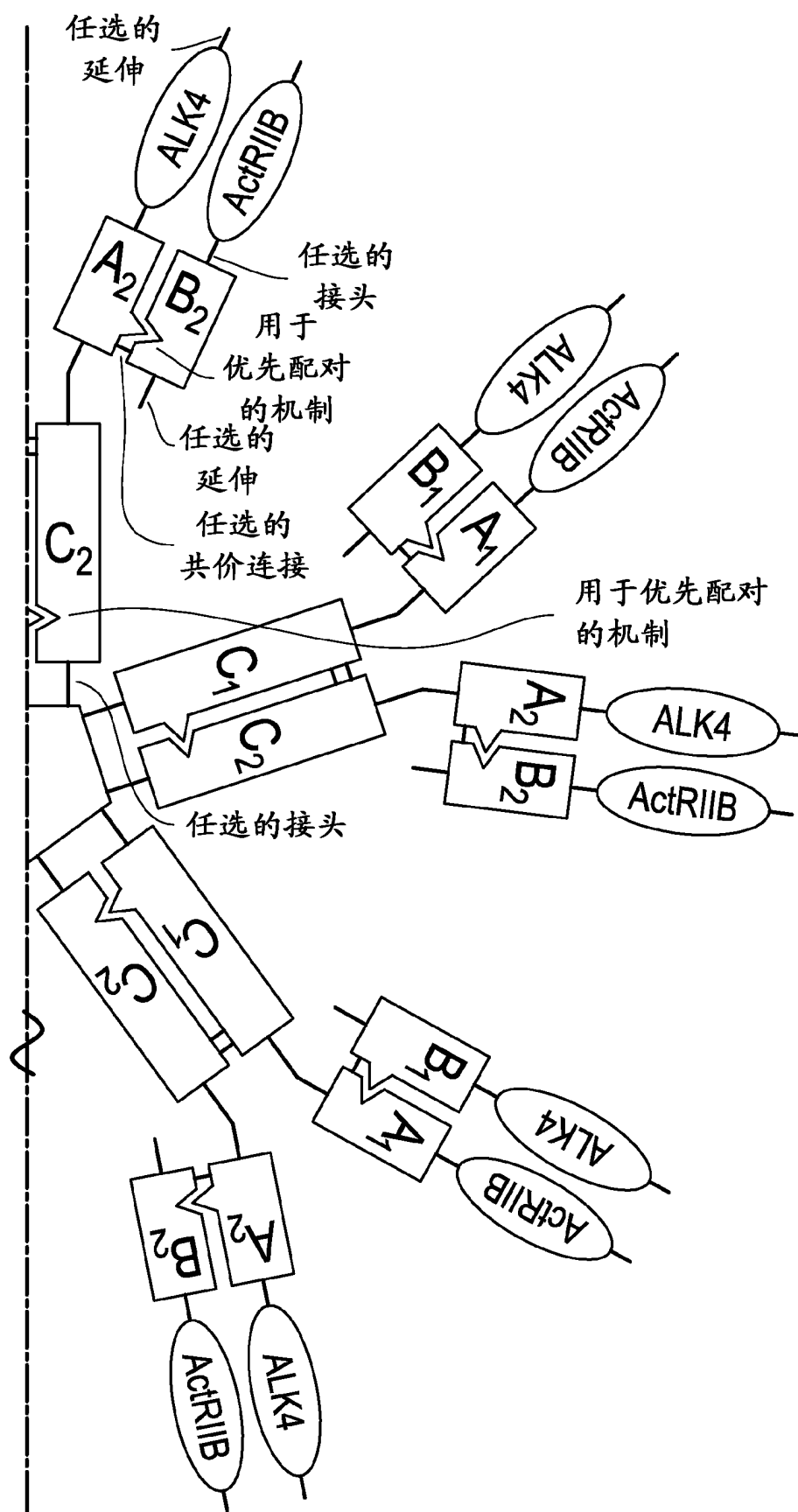


图 9F (部分2)

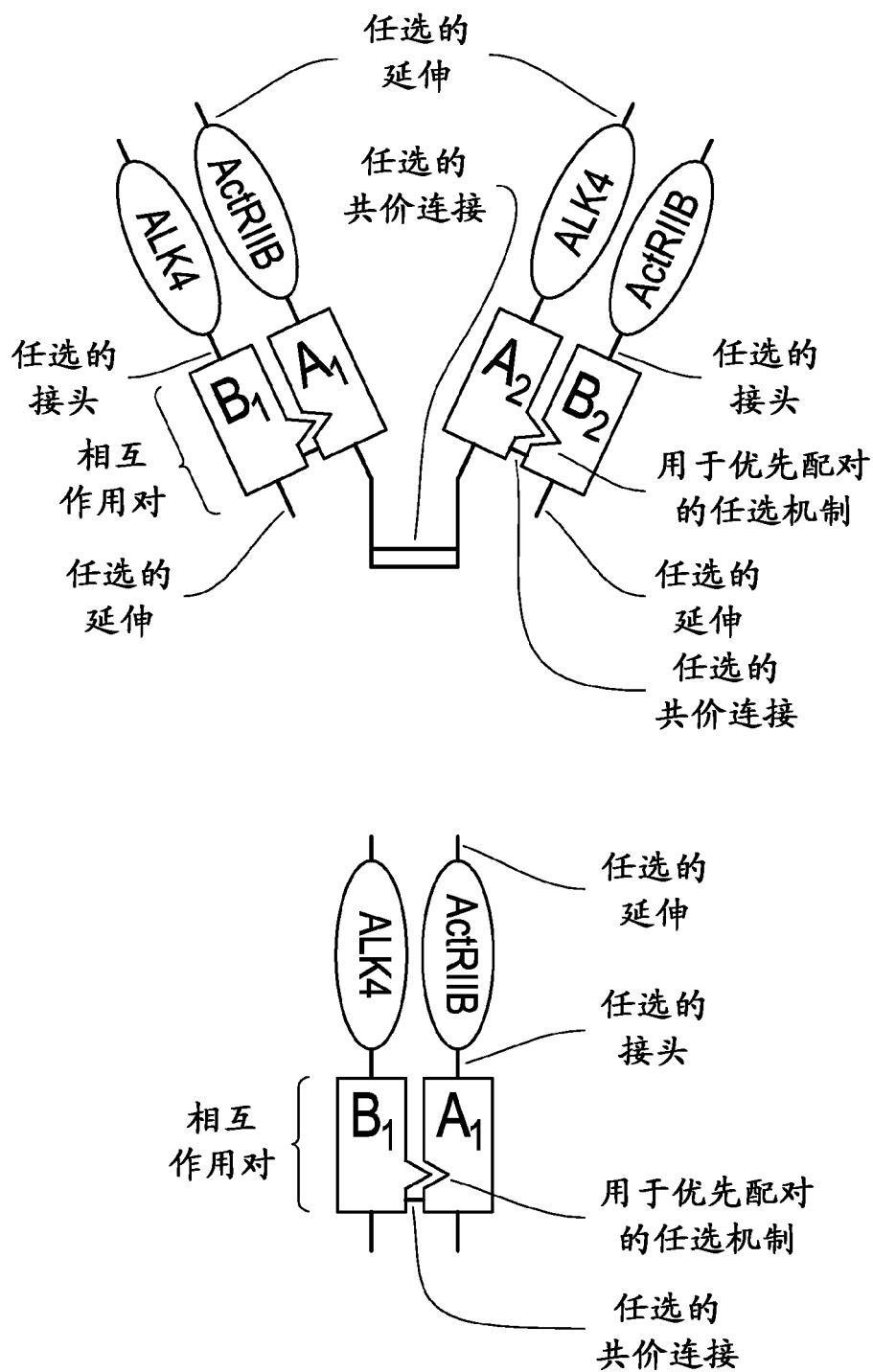


图 9G

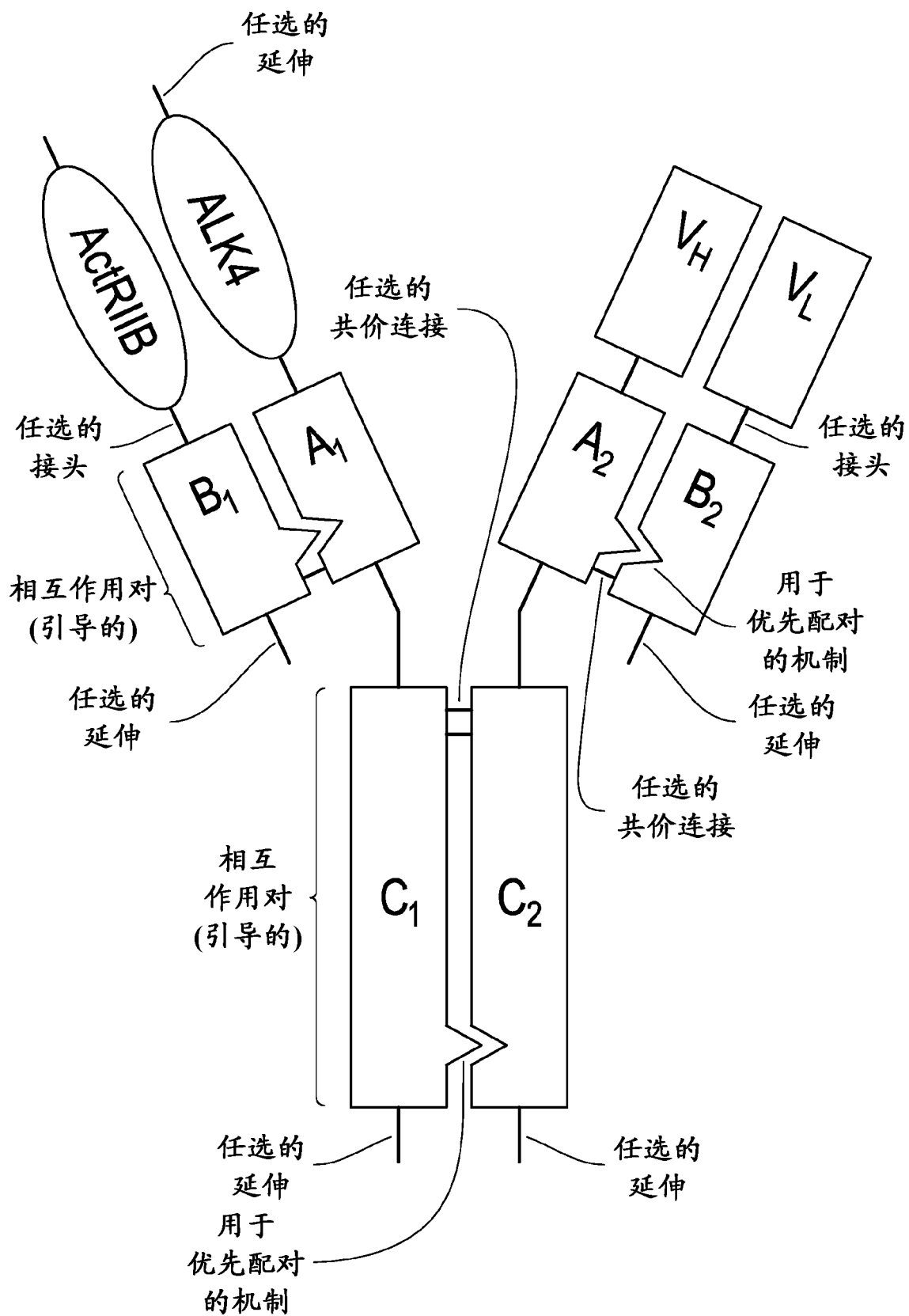


图 10A

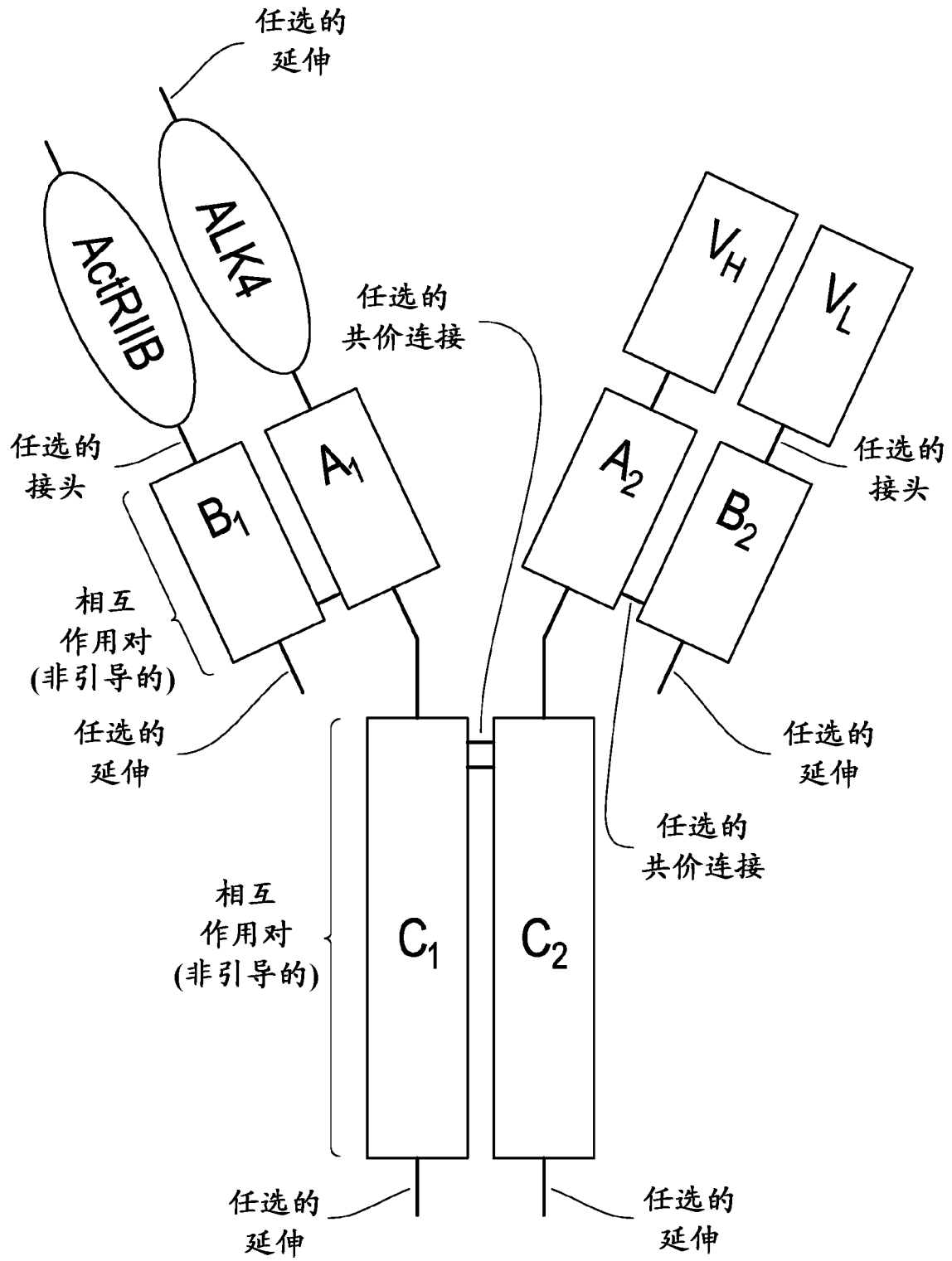


图 10B

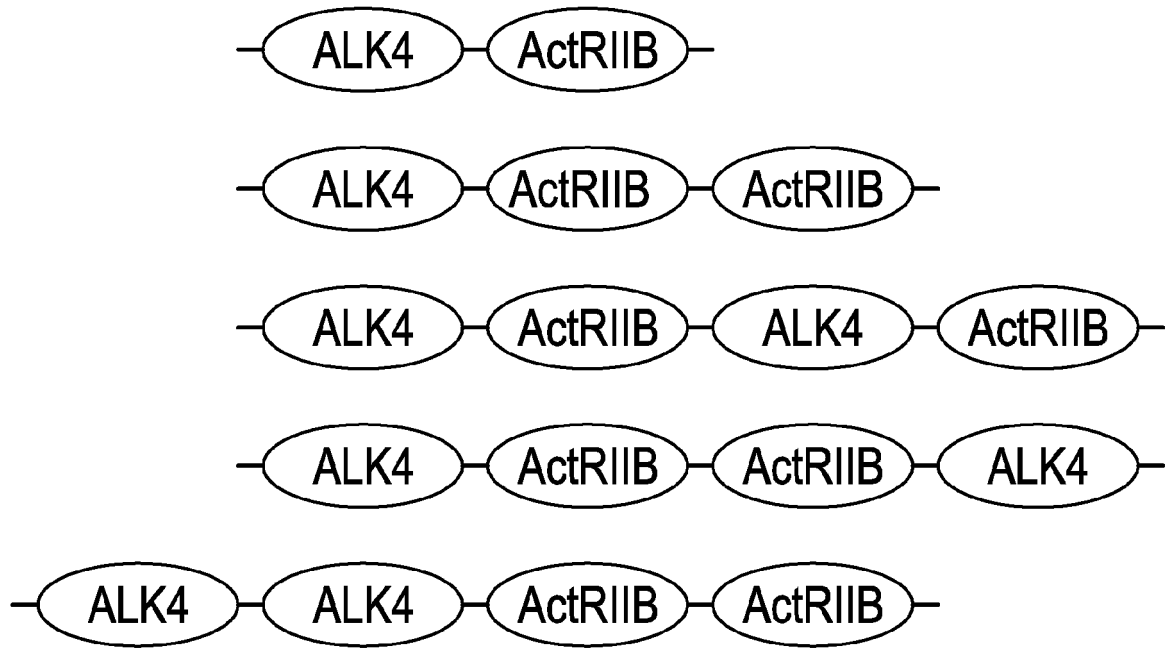


图 11

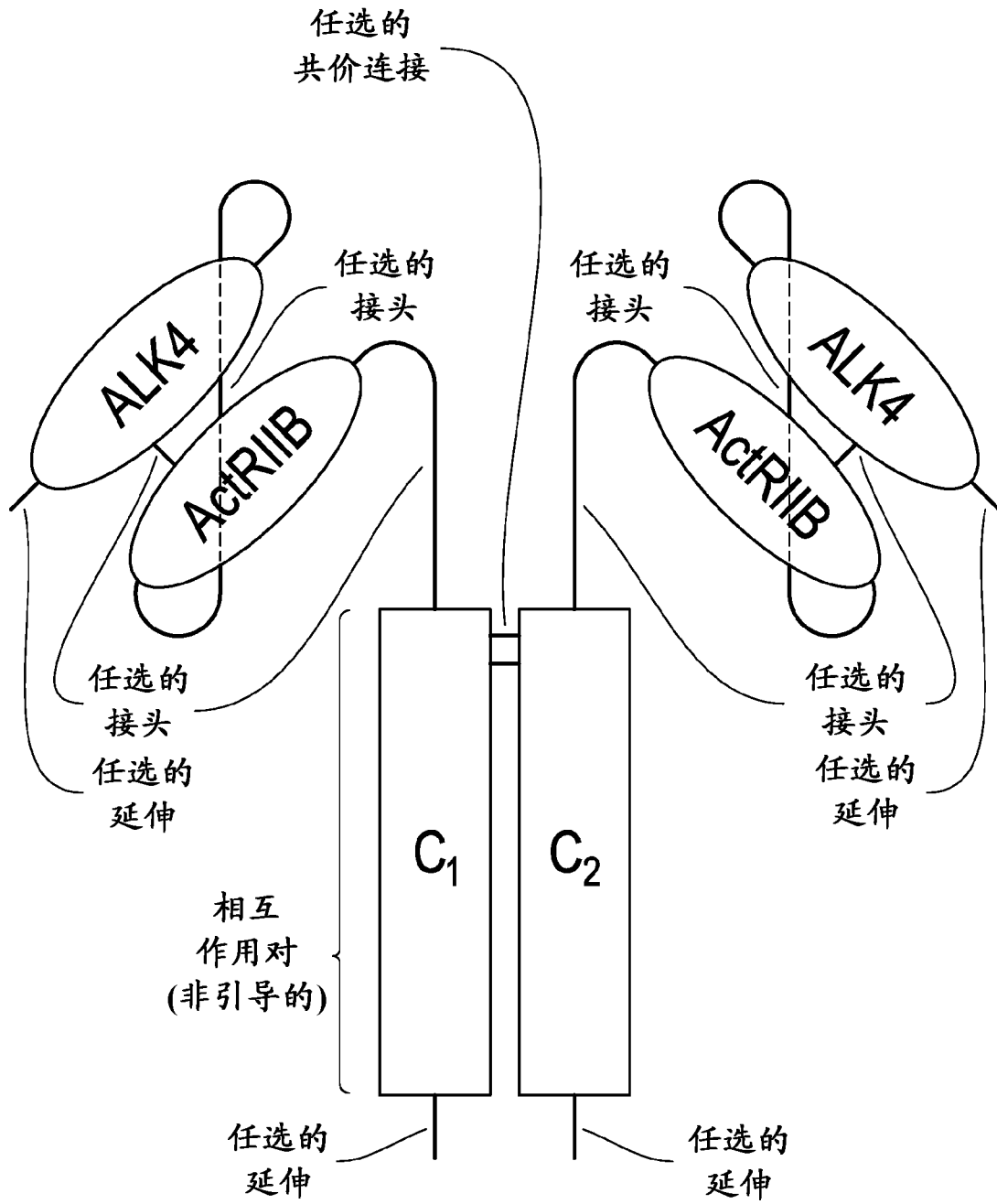


图 12A

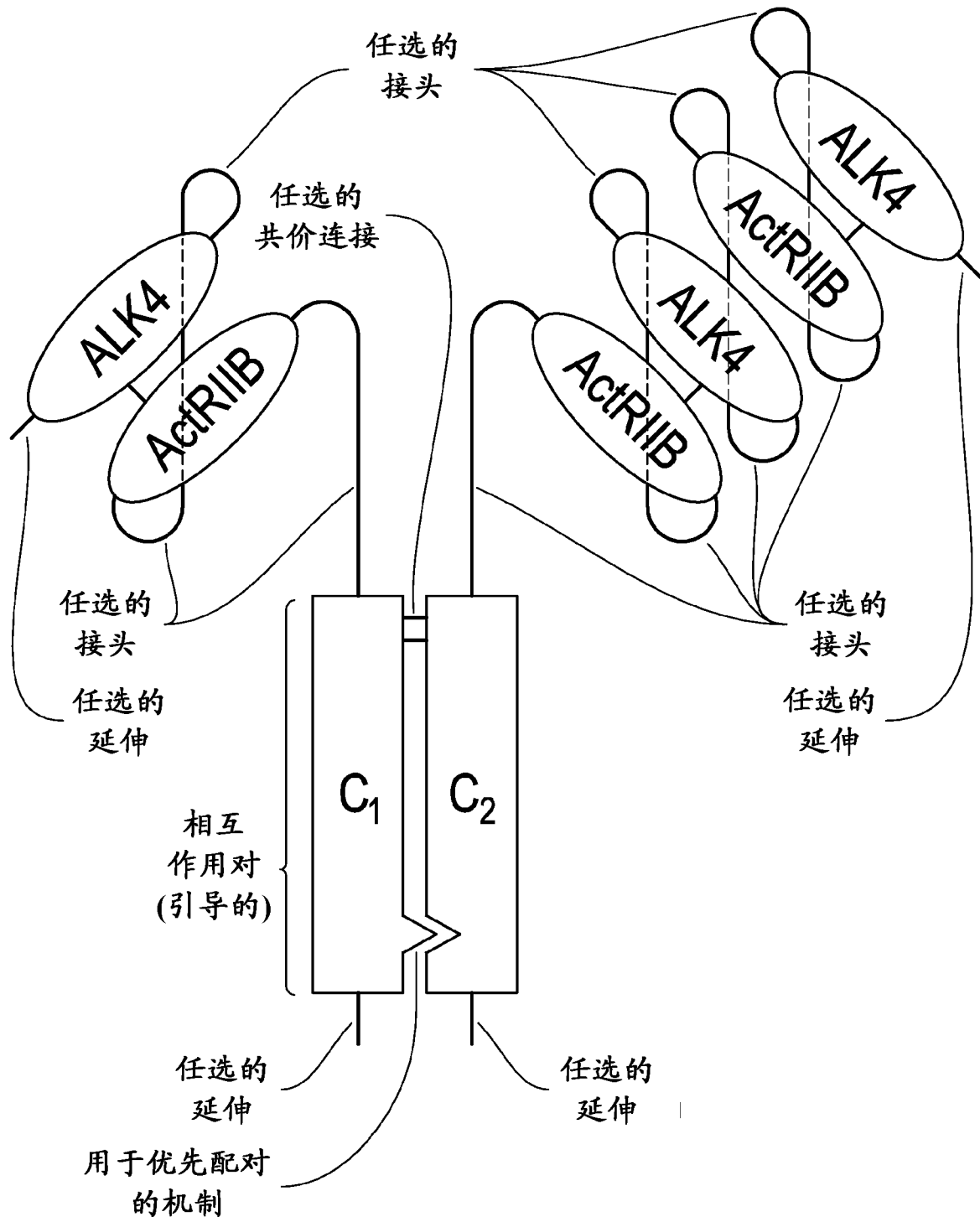


图 12B

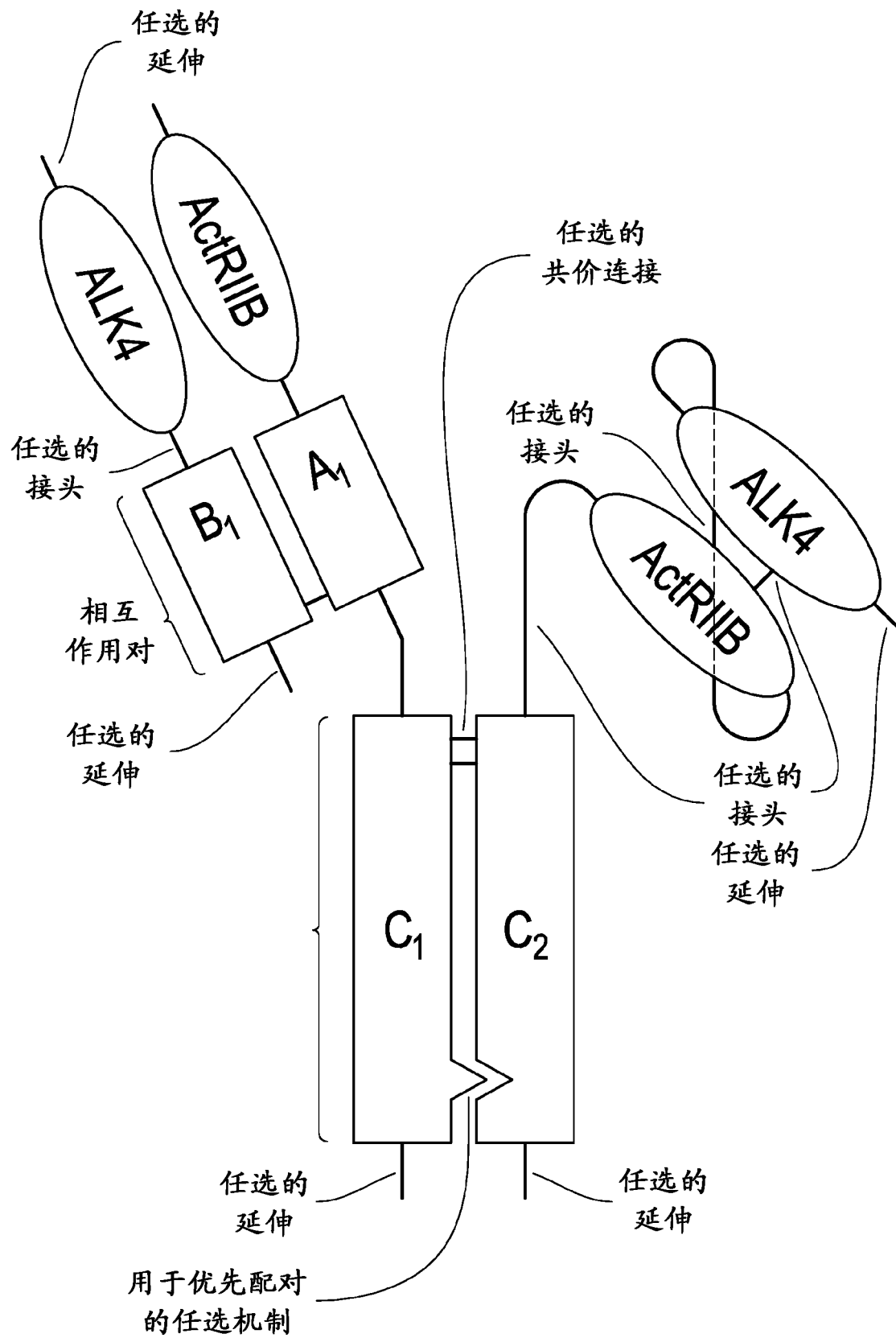


图 12C

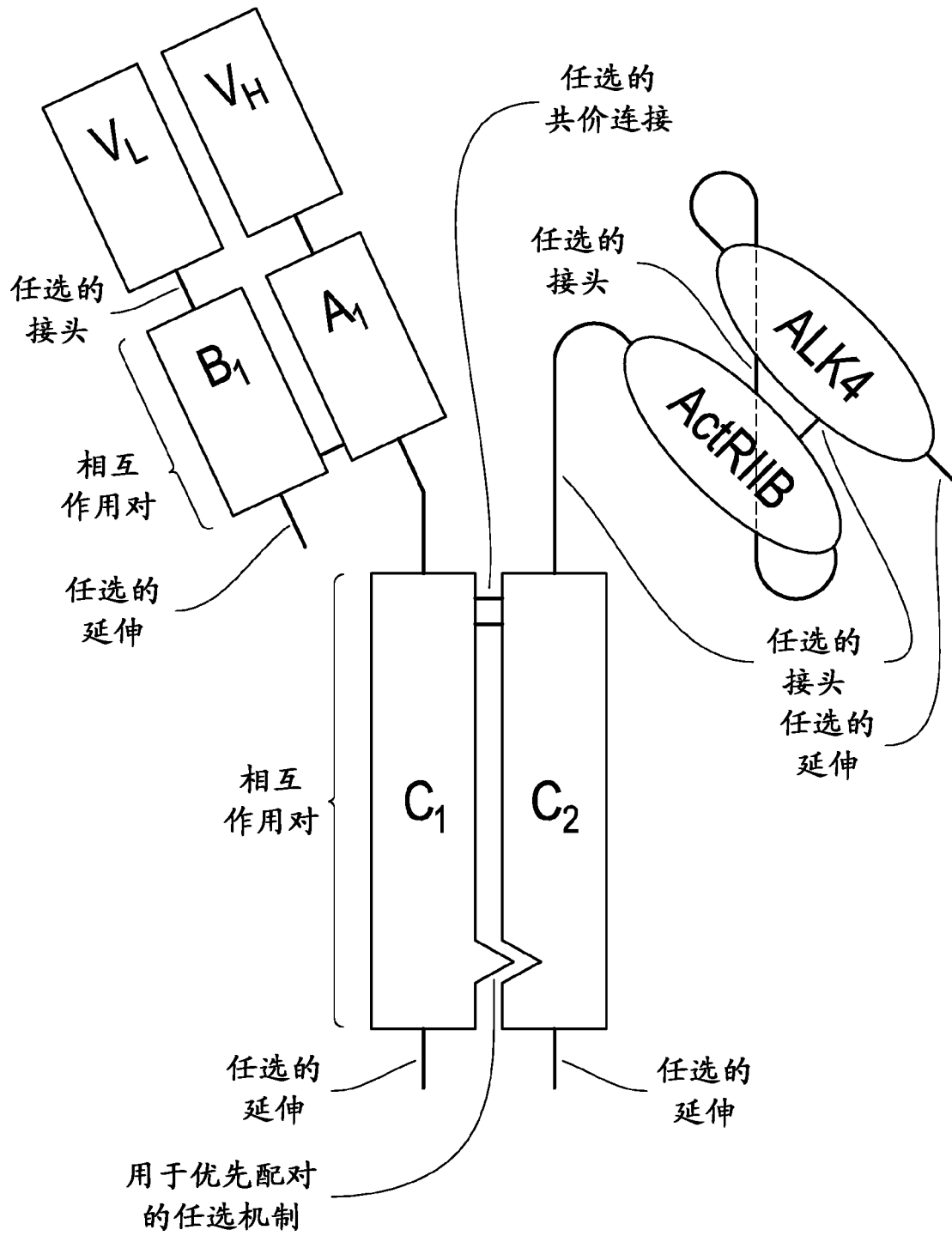


图 12D

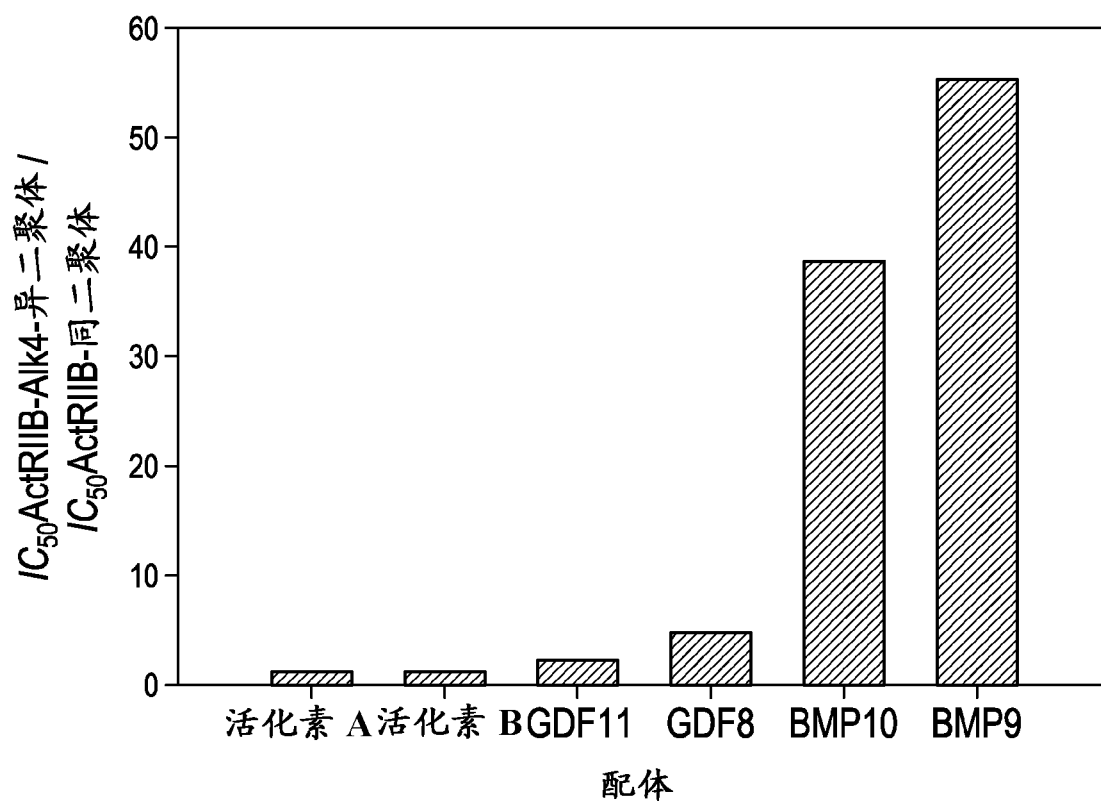


图 13

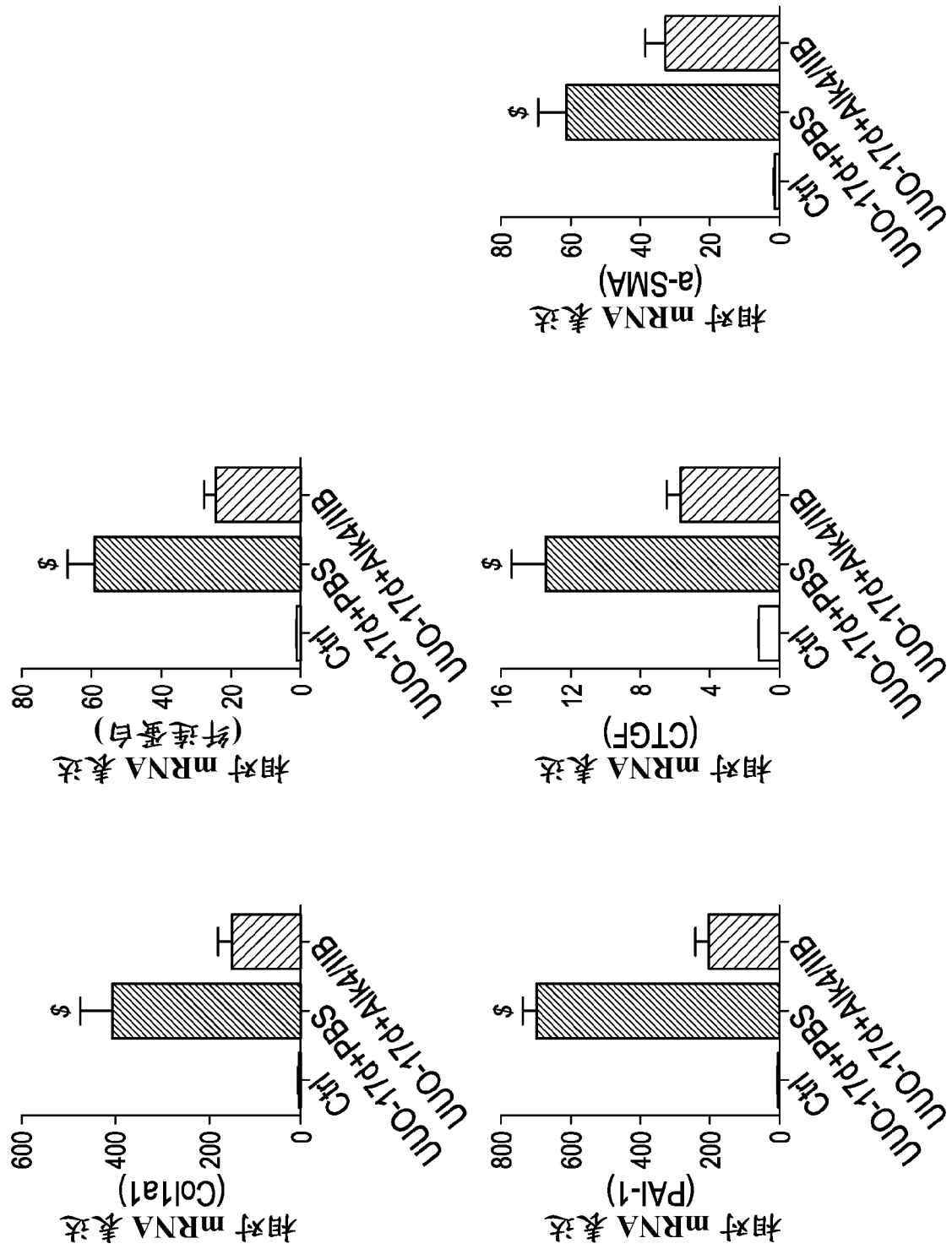


图 14A

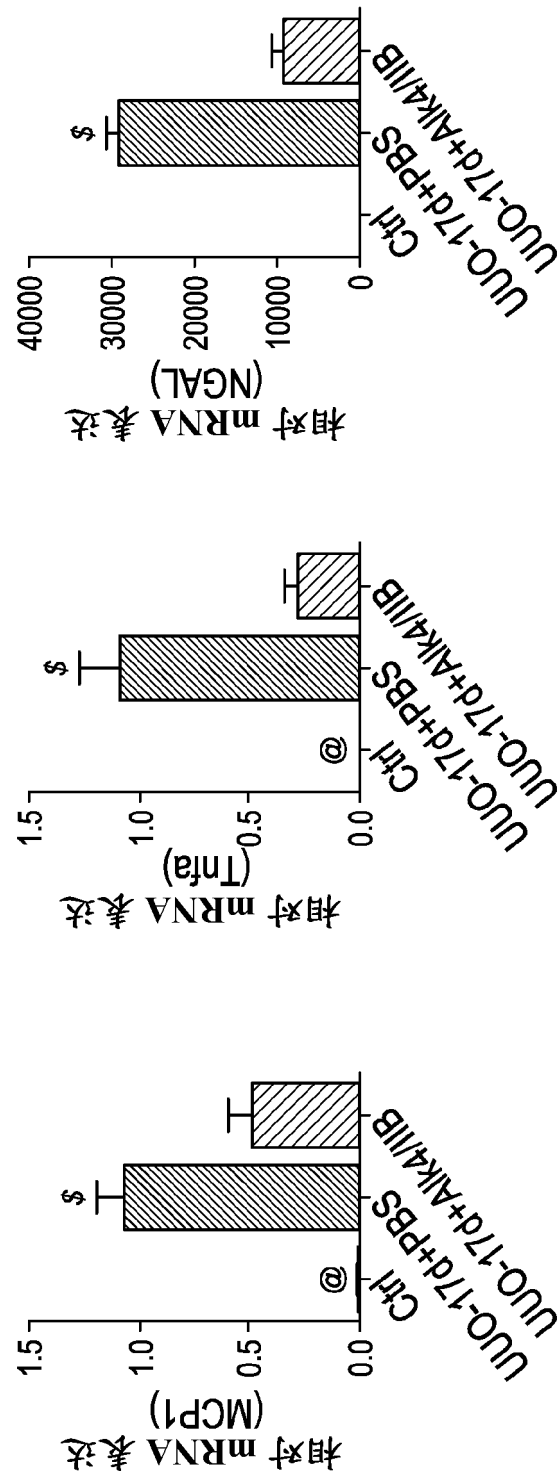


图 14B

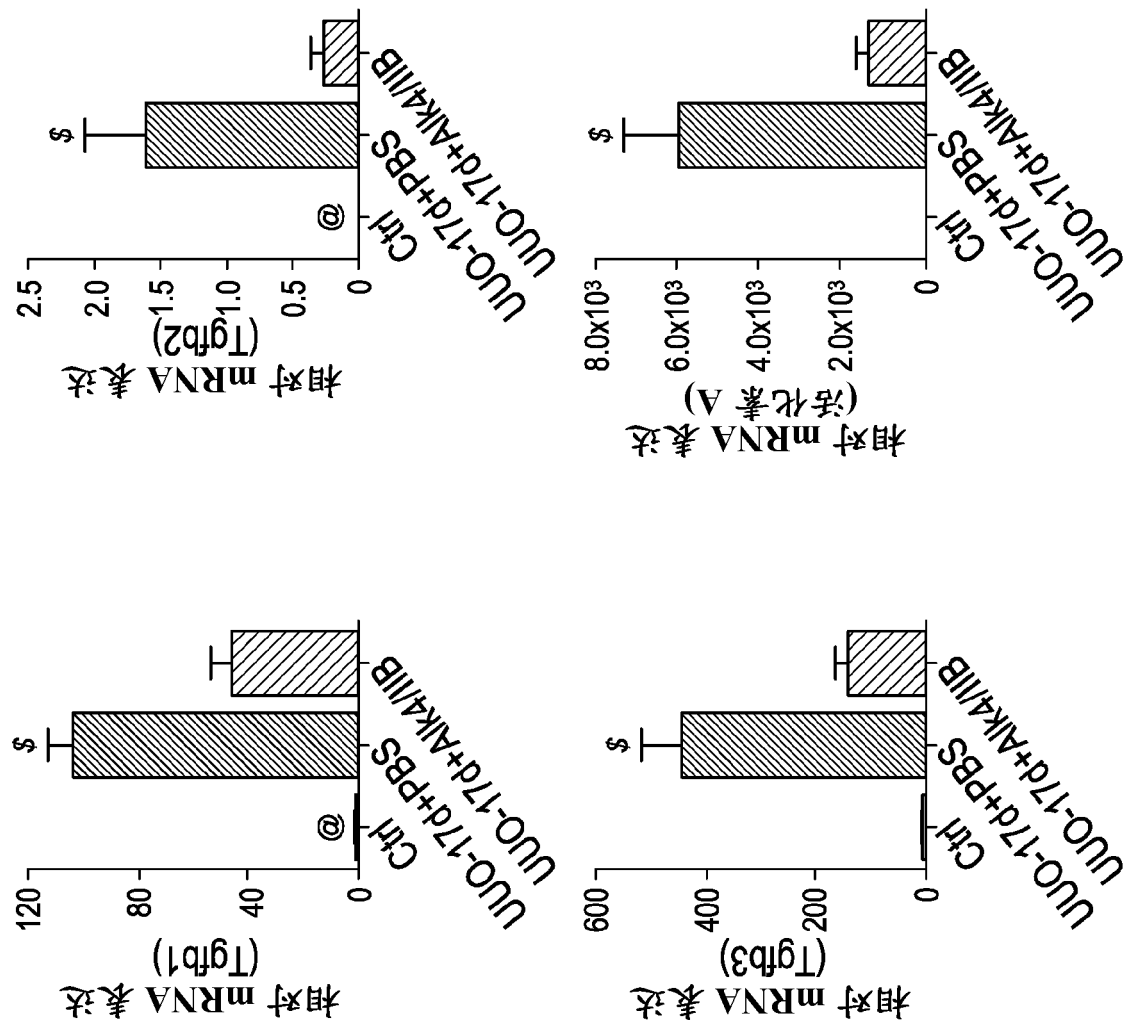


图 14C