



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113896789 A

(43) 申请公布日 2022.01.07

(21) 申请号 202111206744.5

(22) 申请日 2016.09.15

(30) 优先权数据

62/219,094 2015.09.15 US

(62) 分案原申请数据

201680065184.7 2016.09.15

(71) 申请人 供石公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·J·卡文 M·斯特劳布

A·多诺范 K·J·特纳

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

权利要求书1页 说明书70页

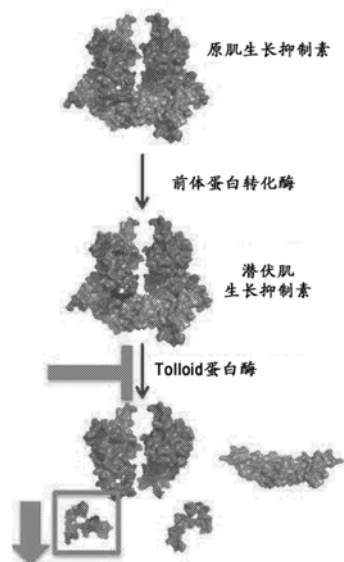
序列表47页 附图40页

(54) 发明名称

抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体及其用途

(57) 摘要

本公开的方面涉及特异性地结合原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素的抗体及其用途。



1. 一种分离的抗体,其包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区。

2. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的重链。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的轻链。

4. 一种分离的抗体,其包含:

重链可变区,包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:6的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和

轻链可变区,包含含有SEQ ID NO:14的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

5. 如权利要求4所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:26的序列。

6. 如权利要求4或权利要求5所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32的序列。

7. 如权利要求4所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:27的序列。

8. 如权利要求4或权利要求7所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:33的序列。

9. 一种分离的抗体,其包含

重链可变区,包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:8的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和

轻链可变区,包含含有SEQ ID NO:16的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

10. 如权利要求9所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:28的序列。

抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2016年9月15日和发明名称为“抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体及其用途”的201680065184.7号中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求2015年9月15日提交且名称为“抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体及其用途”的美国临时专利申请No.62/219,094的优先权,其内容为所有目的并入本文中。

技术领域

[0004] 本公开的实施方式可以包括生长因子活性的调节剂。在一些实施方式中,这样的调节剂可以包括抗体且可以调节TGF- β 家族成员活性和/或生物学。

背景技术

[0005] 肌生长抑制素(myostatin)是分泌的生长因子,其负调节肌肉质量。肌生长抑制素基因中的失能突变(导致超肌肉(hypermuscular)表型)已经在牛、绵羊、鱼、狗和人中描述。肌生长抑制素表达一般限于骨骼肌,在脂肪和心肌组织中报告了低表达水平。肌生长抑制素信号传导的抑制导致肌肉尺寸的增加。

发明内容

[0006] 在一些实施方式中,本公开的方面涉及特异性地结合肌生长抑制素的形式(例如,原肌生长抑制素(proMyostatin)和/或潜伏肌生长抑制素(latent Myostatin))的抗体。例如,本文中提供的抗体特异性地结合肌生长抑制素的原-形式和/或潜伏-形式中的一种或多种,如原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素。在某些方面中,本公开是基于特异性地结合纯的或基本上纯的proGDF8(也称为原肌生长抑制素)的本文中提供的抗体的出人意料的发现。在一些实施方式中,本文中提供的抗体抑制肌生长抑制素信号传导。在一些实施方式中,肌生长抑制素信号传导的抑制可用于增加肌肉质量或防止肌肉萎缩。在一些实施方式中,本文中提供的抗体结合肌生长抑制素并防止肌生长抑制素被前体蛋白转化酶(proprotein convertase)和/或tolloid蛋白酶切割。在一些实施方式中,防止原肌生长抑制素或潜伏肌生长抑制素的切割阻止肌生长抑制素激活。本公开的进一步方面涉及具有对pH敏感的对抗原的亲力的抗体。在一些实施方式中,这样的pH敏感抗体对于从血清清除抗原是有效的。此外,在一些实施方式中,本文中提供的抗体是可以从血清有效地清除抗原(例如,原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素)的清扫抗体(sweeping antibody)。

[0007] 本公开的方面包括包含重链可变域和轻链可变域的抗体,其中重链可变域包含含有如SEQ ID NO:10-11中任一所示的序列的互补决定区3(CDRH3)。在一些实施方式中,抗体特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一些实施方式中,轻链可变域包含含有如SEQ ID NO:22-23中任一所示的序列的互补决定区3(CDRL3)。在另一实施方式中,所述抗体包含六个互补决定区(CDRs):CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中CDRH1包

含如SEQ ID NO:1-3中任一所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:4-9中任一所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:10-11中任一所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:12-17中任一所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:18-21中任一所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:22-23中任一所示的序列。

[0008] 在一些实施方式中,所述CDRH1包含如SEQ ID NO:1或2中所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:4或5中所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:10中所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:12或13中所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:18或19中所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:22中所示的序列。

[0009] 在另一实施方式中,所述CDRH1包含如SEQ ID NO:1或3中所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:6或7中所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:11中所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:14或15中所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:20或21中所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:23中所示的序列。

[0010] 在其它实施方式中,CDRH1包含如SEQ ID NO:1或3中所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:8或9中所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:11中所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:16或17中所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:20或21中所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:23中所示的序列。

[0011] 在另一实施方式中,所述抗体包含如SEQ ID NO:25-29中任一所示的重链可变域序列。在一些实施方式中,所述抗体包含如SEQ ID NO:30-35中任一所示的轻链可变域序列。

[0012] 本公开的其它方面包括特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素且包含重链可变域和轻链可变域的抗体,其中轻链可变域包含含有如SEQ ID NO:22-23中任一所示的序列的互补决定区3 (CDRL3)。在一些实施方式中,所述抗体包含SEQ ID NO:30的轻链可变域序列。

[0013] 本公开的一些方面涉及具有选自以下的序列的多肽:SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO 29。在一些实施方式中,多肽是重链可变域。在一些实施方式中,多肽与SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO 29中所示的任一氨基酸序列至少75% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 相同。

[0014] 本公开的一些方面涉及具有选自以下的序列的多肽:SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO 35。在一些实施方式中,多肽是轻链可变域。在一些实施方式中,多肽与SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO 35中所示的任一氨基酸序列至少75% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 相同。

[0015] 本公开的另一方面包括与上述抗体竞争结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体。在一些实施方式中,所述抗体在与上述抗体相同的表位处结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在另一实施方式中,抗体以抗体与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素之间小于 10^{-6} M的平衡解离常数Kd竞争结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在其它实施方式中,所述抗体的Kd在 10^{-11} M至 10^{-6} M的范围内。

[0016] 在一些实施方式中,抗体是人源化抗体、双链抗体、嵌合抗体、Fab片段、F(ab')₂片

段或Fv片段。在另一实施方式中,抗体是人源化抗体。在另一实施方式中,抗体是人抗体。在一些实施方式中,抗体包含具有人种系序列的框架。在另一实施方式中,抗体包含选自IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM和IgE恒定域的重链恒定域。在一些实施方式中,抗体包含IgG4的恒定域。在其它实施方式中,抗体包含具有Ser至Pro的骨架置换的IgG₄恒定域,其产生IgG₁-样铰链并允许形成链间二硫键。在另一实施方式中,抗体与选自荧光剂、发光剂、酶试剂和放射活性剂的试剂偶联。

[0017] 在另一实施方式中,抗体与成熟肌生长抑制素相比特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一些实施方式中,抗体与转化生长因子 β 家族的另一成员相比特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在另一实施方式中,所述成员是GDF11或激活素。

[0018] 本公开的进一步方面包括特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素且抑制通过tolloid蛋白酶蛋白水解形成成熟肌生长抑制素的抗体。在一些实施方式中,所述抗体以小于1 μ M的IC50抑制通过tolloid蛋白酶蛋白水解形成成熟肌生长抑制素。在一些实施方式中,抗体是与人和鼠原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素交叉反应的。在其它实施方式中,抗体与GDF11或激活素相比特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在另一实施方式中,抗体与成熟肌生长抑制素相比特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。

[0019] 本公开的另一方面包括减少包含原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的培养基中存在的细胞中的肌生长抑制素受体激活的方法,该方法包括以有效抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解激活的量向培养基递送上述抗体。在一些实施方式中,培养基进一步包含前体蛋白转化酶。在其它实施方式中,培养基进一步包含tolloid蛋白酶。在另一实施方式中,抗体以有效抑制通过tolloid蛋白酶的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解激活的量递送到培养基。在一些实施方式中,细胞是在体外。在其它实施方式中,细胞是在体内。

[0020] 本公开的另一方面包括治疗患有肌病的受试者的方法,该方法包括向受试者施用有效量的上述抗体。在一些实施方式中,肌病是原发性肌病。在另一实施方式中,原发性肌病包括失用性萎缩。在其它实施方式中,失用性萎缩与髌骨折、选择性关节置换(elective joint replacement)、危重病肌病、脊髓损伤或中风相关。在一些实施方式中,肌病是继发性肌病,其中肌肉损失继发于疾病病理。在其它实施方式中,继发性肌病包括去神经支配、遗传性肌无力或恶病质。在另一实施方式中,继发性肌病是与肌萎缩性脊髓侧索硬化或脊髓性肌萎缩相关的去神经支配。在一些实施方式中,继发性肌病是与肌营养不良相关的遗传性肌无力。在其它实施方式中,继发性肌病是与肾衰竭、AIDS、心脏病、癌症或老化相关的恶病质。

[0021] 本公开的另一方面包括治疗患有与老化相关的疾病或病症的受试者的方法。与老化相关的示例性疾病或病症包括,但不限于少肌症(年龄相关的肌肉损失)、虚弱和雄激素缺乏。

[0022] 本公开的另一方面包括治疗患有与失用性萎缩/创伤相关的疾病或病症的受试者的方法。与失用性萎缩/创伤相关的示例性疾病或病症包括,但不限于与在重症监护室(ICU)中花费的时间相关的肌无力、髌/关节置换、髌骨折、中风、卧床、SCI、肩袖损伤、膝关

节置换、骨折和烧伤。

[0023] 本公开的另一方面包括治疗患有神经变性疾病或病症的受试者的方法。示例性的神经变性疾病或病症包括,但不限于脊髓性肌萎缩和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)。

[0024] 本公开的另一方面包括治疗患有与恶病质相关的疾病或病症的受试者的方法。与恶病质相关的示例性疾病或病症包括,但不限于癌症、慢性心力衰竭、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、慢性阻塞性肺病(COPD)和慢性肾病(CKD)。

[0025] 本公开的另一方面包括治疗患有与罕见疾病相关的疾病或病症的受试者的方法。示例性的罕见疾病和病症包括,但不限于成骨不全症、散发性包涵体肌炎和急性淋巴细胞性白血病。

[0026] 本公开的另一方面包括治疗患有与代谢障碍和/或身体组成相关的疾病或病症的受试者的方法。在一些实施方式中,疾病或病症是肥胖症(例如,重度肥胖)、Prader-Willi、II型糖尿病或厌食症。但是,与代谢障碍和/或身体组成相关的另外的疾病或病症在本公开的范围之内。

[0027] 本公开的另一方面包括治疗患有与先天性肌病相关的疾病或病症的受试者的方法。示例性的先天性肌病包括,但不限于X-连锁肌管性肌病、常染色体显性中央核肌病、常染色体隐性中央核肌病、线状体肌病和先天性纤维型不相称性肌病。

[0028] 本公开的另一方面包括治疗患有与肌肉萎缩症相关的疾病或病症的受试者的方法。示例性的肌肉萎缩症包括,但不限于杜氏肌肉萎缩症、贝克型肌肉萎缩症、面肩胛肱型肌营养不良症(FSH)和肢带型肌营养不良症。

[0029] 本公开的另一方面包括治疗患有妇科泌尿相关疾病或病症、语言障碍(狭窄)、眼外肌病、腕管综合症、格林-巴利综合症或骨肉瘤的受试者的方法。

[0030] 在一些实施方式中,治疗导致受试者中改善的肌肉强度。在其它实施方式中,治疗导致受试者中改善的代谢状态。

[0031] 在一些实施方式中,抗体以0.1mg/kg-100mg/kg的范围内的剂量施用。在另一实施方式中,抗体以0.3mg/kg-30mg/kg的范围内的剂量施用。

[0032] 在一些实施方式中,抗体静脉内施用于受试者。在其它实施方式中,抗体皮下施用于受试者。在另一实施方式中,抗体以多个时机(on multiple occasions)施用于受试者。在一些实施方式中,所述多次施用至少每月进行。在另一实施方式中,所述多次施用至少每周进行。

[0033] 本公开的进一步方面包括包含上述任何抗体和载体的组合物。在一些实施方式中,所述载体是药学上可接受的载体。在其它实施方式中,抗体和载体为冻干形式。在另一实施方式中,抗体和载体在溶液中。在一些实施方式中,抗体和载体是冷冻的。在其它实施方式中,抗体和载体在低于或等于-65℃的温度下冷冻。

[0034] 本公开的其它方面包括编码包含三个互补决定区(CDR)的蛋白质的分离的核酸:CDRH1、CDRH2和CDRH3,其中CDRH3包含如SEQ ID NO:10或11中所示的序列。在一些实施方式中,所述CDRH1包含如SEQ ID NO:1、2或3中所示的序列。在其它实施方式中,CDRH2包含如SEQ ID NO:4-9中任一所示的序列。

[0035] 本公开的另一方面包括编码包含三个互补决定区(CDR)的蛋白质的分离的核酸:CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中CDRL3包含如SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些实施方式中,

所述CDRL1包含如SEQ ID NO:12-17中任一所示的序列。在其它实施方式中,CDRL2包含如SEQ ID NO:18-21中任一所示的序列。

[0036] 本公开的进一步方面包括包含如SEQ ID NO:38-49中任一所示的序列的分离的核酸。

[0037] 本公开的另一方面包括包含上述分离的核酸的分离的细胞。

[0038] 在一些方面中,本公开包括评估从患有肌病的受试者获得的生物样品的方法。在一些实施方式中,该方法包括:制备包含从受试者获得的生物样品的蛋白质和特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体的免疫反应混合物;将免疫反应混合物保持在允许形成抗体和原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素之间的结合复合物的条件下;和测定结合复合物形成的水平。在一些实施方式中,该方法包括:制备包含从受试者获得的生物样品的蛋白质和特异性地结合原肌生长抑制素的抗体的免疫反应混合物;将免疫反应混合物保持在允许形成抗体和原肌生长抑制素之间的结合复合物的条件下;和测定结合复合物形成的水平。在一些实施方式中,该方法包括:制备包含从受试者获得的生物样品的蛋白质和特异性地结合潜伏肌生长抑制素的抗体的免疫反应混合物;将免疫反应混合物保持在允许形成抗体和潜伏肌生长抑制素之间的结合复合物的条件下;和测定结合复合物形成的水平。在一些实施方式中,该方法包括:制备包含从受试者获得的生物样品的蛋白质和特异性地结合成熟肌生长抑制素的抗体的免疫反应混合物;将免疫反应混合物保持在允许形成抗体和成熟肌生长抑制素之间的结合复合物的条件下;和测定结合复合物形成的水平。

[0039] 在一个方面中,本文公开了包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区的分离的抗体。在一个实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的重链。在另一实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的轻链。

[0040] 在另一个方面中,本文公开了包含重链可变区和轻链可变区的分离的抗体,重链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:6的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和轻链可变区包含含有SEQ ID NO:14的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

[0041] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:26的序列。在另一实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:32的序列。

[0042] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:27的序列。在另一实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:33的序列。

[0043] 在另一个方面中,本文公开了包含重链可变区和轻链可变区的分离的抗体,重链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:8的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和轻链可变区包含含有SEQ ID NO:16的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

[0044] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:28的序列。在另一实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:34的序列。

[0045] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:29的序列。在一个实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:35的序列。

[0046] 在一个实施方式中,抗体是人抗体。在一个实施方式中,抗体包含IgG4恒定域。在

一个实施方式中,抗体包含具有Ser至Pro的骨架置换的IgG₄恒定域,其产生IgG₁-样铰链并允许形成链间二硫键。

[0047] 在一个实施方式中,抗体特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一个实施方式中,抗体特异性地结合原肌生长抑制素。在另一实施方式中,抗体特异性地结合潜伏肌生长抑制素。在一个实施方式中,抗体不结合成熟肌生长抑制素。

[0048] 在一个实施方式中,抗体抑制通过tolloid蛋白酶的成熟肌生长抑制素的蛋白水解形成。在一个实施方式中,抗体以小于1 μ M的IC50抑制通过tolloid蛋白酶的成熟肌生长抑制素的蛋白水解形成。

[0049] 在一个实施方式中,抗体是与人或鼠原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素交叉反应的。在另一实施方式中,抗体结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素但不结合GDF11或激活素。

[0050] 在一个方面中,本文公开了减少包含原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的培养基中存在的细胞中的肌生长抑制素受体激活的方法,该方法包括以有效抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解激活的量向培养基递送本文所述的抗体。在一个实施方式中,培养基包含前体蛋白转化酶。在另一实施方式中,培养基包含tolloid蛋白酶。在一个实施方式中,细胞是在体外。在另一实施方式中,细胞是在体内。

[0051] 在另一个方面中,本文公开了治疗患有肌病的受试者的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体。

[0052] 在一个实施方式中,肌病是原发性肌病。在另一实施方式中,原发性肌病是失用性萎缩。在一个实施方式中,失用性萎缩与髌骨折、选择性关节置换、危重病肌病、脊髓损伤和/或中风相关。

[0053] 在另一实施方式中,肌病是继发性肌病,其中肌肉损失继发于疾病病理。在一个实施方式中,继发性肌病包括去神经支配、遗传性肌无力或恶病质。在另一实施方式中,继发性肌病是与肌萎缩性脊髓侧索硬化或脊髓性肌萎缩相关的去神经支配。在再另一个实施方式中,继发性肌病是与肌营养不良相关的遗传性肌无力。在一个实施方式中,继发性肌病是与肾衰竭、AIDS、心脏病、癌症或老化相关的恶病质。

[0054] 在一个实施方式中,施用导致受试者中改善的肌肉强度。在一个实施方式中,施用导致受试者中改善的代谢状态。

[0055] 在一个实施方式中,抗体以0.1mg/kg-100mg/kg的范围内的剂量施用。在另一实施方式中,抗体以0.3mg/kg-30mg/kg的范围内的剂量施用。

[0056] 在一个实施方式中,抗体静脉内施用于受试者。在另一实施方式中,抗体皮下施用于受试者。

[0057] 在一个实施方式中,抗体以多个时机施用于受试者。在一个实施方式中,多次施用至少每月进行。在另一实施方式中,多次施用至少每周进行。

[0058] 在另一个方面中,本文公开了包含本文公开的抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。在一个实施方式中,组合物是冻干组合物。在另一实施方式中,组合物是液体组合物。在一个实施方式中,组合物是冷冻的。在一个实施方式中,组合物在低于或等于-65℃的温度下冷冻。

[0059] 在另一个方面中,本文公开了包含本文所述的药物组合物的注射器。

[0060] 在另一个方面中,本文公开了编码包含含有SEQ ID NO:39的核酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:45的核酸序列的轻链可变区的抗体的分离的核酸。

[0061] 在另一个方面中,本文公开了编码包含重链可变区和轻链可变区的抗体的分离的核酸,重链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:6的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和轻链可变区包含含有SEQ ID NO:14的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

[0062] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:40的序列。在一个实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:46的序列。

[0063] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:41的序列。在另一实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:47的序列。

[0064] 在另一个实施方式中,本文公开了编码包含重链可变区和轻链可变区的抗体的分离的核酸,重链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:8的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和轻链可变区包含含有SEQ ID NO:16的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

[0065] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:42的序列。在另一实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:48的序列。

[0066] 在一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:43的序列。在另一实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:49的序列。

[0067] 在另一个方面中,本文公开了包含本文所述的分离的核酸的分离的细胞。

[0068] 特别地,本发明涉及以下各项:

[0069] 1.一种分离的抗体,其包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区。

[0070] 2.如第1项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的重链。

[0071] 3.如第1项或第2项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的轻链。

[0072] 4.一种分离的抗体,其包含:

[0073] 重链可变区,包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:6的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和

[0074] 轻链可变区,包含含有SEQ ID NO:14的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

[0075] 5.如第4项所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:26的序列。

[0076] 6.如第4项或第5项所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32的序列。

[0077] 7.如第4项所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:27的序列。

[0078] 8.如第4项或第7项所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:33的序列。

[0079] 9.一种分离的抗体,其包含

[0080] 重链可变区,包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:8的CDRH2序列

和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和

[0081] 轻链可变区,包含含有SEQ ID NO:16的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。

[0082] 10.如第9项所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:28的序列。

[0083] 11.如第9项或第10项所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:34的序列。

[0084] 12.如第9项所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:29的序列。

[0085] 13.如第9项或第12项所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:35的序列。

[0086] 14.如第1-13项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是人抗体。

[0087] 15.如第1-14项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含IgG₄恒定域。

[0088] 16.如第1-14项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含具有Ser至Pro的骨架置换的IgG₄恒定域,其产生IgG₁-样铰链并允许形成链间二硫键。

[0089] 17.如第1-16项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。

[0090] 18.如第1-17项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体不结合成熟肌生长抑制素。

[0091] 19.如第1-18项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制通过tolloid蛋白酶蛋白水解形成成熟肌生长抑制素。

[0092] 20.如第19项所述的分离的抗体,其中所述抗体以小于1 μ M的IC₅₀抑制通过tolloid蛋白酶蛋白水解形成成熟肌生长抑制素。

[0093] 21.如第19项或第20项所述的分离的抗体,其中所述抗体是与人和鼠原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素交叉反应的。

[0094] 22.如第19-21项任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素但不结合GDF11或激活素。

[0095] 23.一种减少包含原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的培养基中存在的细胞中的肌生长抑制素受体激活的方法,该方法包括以有效抑制所述原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解激活的量向所述培养基递送第1-22项任一项所述的抗体。

[0096] 24.一种治疗患有肌病的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的第1-22项任一项所述的抗体。

[0097] 25.一种药物组合物,其包含第1-22项任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

[0098] 26.如第25项所述的药物组合物,其中所述组合物是冻干组合物。

[0099] 27.如第25项所述的药物组合物,其中所述组合物是液体组合物。

[0100] 28.如第25项所述的药物组合物,其中所述组合物是冷冻的。

[0101] 29.如第28项所述的药物组合物,其中所述组合物在低于或等于-65 $^{\circ}$ C的温度下冷冻。

[0102] 30.一种包含第25-29项任一项所述的药物组合物的注射器。

[0103] 31.一种分离的核酸,其编码包含含有SEQ ID NO:39的核酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:45的核酸序列的轻链可变区的抗体。

- [0104] 32.一种分离的核酸,其编码包含以下的抗体:
- [0105] 重链可变区,包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:6的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和
- [0106] 轻链可变区,包含含有SEQ ID NO:14的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。
- [0107] 33.如第32项所述的分离的核酸,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:40的序列。
- [0108] 34.如第32项或第33项所述的分离的核酸,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:46的序列。
- [0109] 35.如第32项所述的分离的核酸,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:41的序列。
- [0110] 36.如第32项或第35项所述的分离的核酸,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:47的序列。
- [0111] 37.一种分离的核酸,其编码包含以下的抗体:
- [0112] 重链可变区,包含含有SEQ ID NO:1的CDRH1序列、含有SEQ ID NO:8的CDRH2序列和含有SEQ ID NO:11的CDRH3序列;和
- [0113] 轻链可变区,包含含有SEQ ID NO:16的CDRL1序列、含有SEQ ID NO:20的CDRL2序列和含有SEQ ID NO:23的CDRL3序列。
- [0114] 38.如第37项所述的分离的核酸,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:42的序列。
- [0115] 39.如第37项或第38项所述的分离的核酸,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的序列。
- [0116] 40.如第37项所述的分离的核酸,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:43的序列。
- [0117] 41.如第37项或第40项所述的分离的核酸,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49的序列。
- [0118] 42.一种分离的细胞,包含第31-41项任一项所述的分离的核酸。

附图说明

[0119] 图1A-1B显示肌生长抑制素域结构和原肌生长抑制素组装。图1A显示作为原蛋白分泌的肌生长抑制素,其具有抑制性前结构域(prodomain)和随后的C-末端生长因子结构域,该原蛋白作为二硫键连接的二聚体存在。图1B显示以无活性构象组装的前体蛋白,其中前结构域(深灰色)以“紧身衣”组装包围生长因子(浅灰色)。该图形是从潜伏TGF β 1的结构(Shi等Nature 2011)的适应。

[0120] 图2显示肌生长抑制素的激活涉及两个不同的蛋白酶事件,从而产生三种主要肌生长抑制素种类。生物合成前体蛋白,原肌生长抑制素,通过两种单独的蛋白酶处理。原肌生长抑制素(和proGDF11)的切割通过前体蛋白转化酶如Furin/PACE3(偶合基本氨基酸裂解酶(Paired Basic Amino acid Cleaving Enzyme)3)或PCSK5(前体蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 5型)进行,其切开前结构域和成熟生长因子之间的保守RXXR位点。这一切割产生潜伏复合物,其中成熟生长因子被前结构域屏蔽而不与其受体结合。激活和活性生长因子的释放通过来自BMP/tolloid家族的另外的蛋白酶如TLL-2(Tolloid-样蛋白2)或BMP1(骨形态发生蛋白1)在切割后完成。这些切割事件产生肌生长抑制素的成熟形式,其可以称为活性肌生长抑制素或成熟肌生长抑制素。

[0121] 图3A-3C显示Ab1阻断原肌生长抑制素通过蛋白酶tolloid家族的成员的切割。与增加量的Ab1预孵育的潜伏肌生长抑制素样品在肌生长抑制素激活试验中分析。在通过报告试验(图3A)分析肌生长抑制素释放后,样品然后在还原条件下运行并使用针对肌生长抑制素的前结构域产生的抗体通过蛋白质印迹探测(图3B)。~18kDa条带(方框),对应于在tolloid切割后产生的前结构域的ARM部分,随增加的Ab1剂量成比例地减小。潜伏和原肌生长抑制素标准品(加载的45ng)显示~50kDa处的原肌生长抑制素和~37kDa处的前结构域的迁移。图3C显示肌生长抑制素的激活涉及两个不同的蛋白酶事件,从而产生三种主要肌生长抑制素种类。生物合成前体蛋白,原肌生长抑制素,通过两种单独的蛋白酶处理。原肌生长抑制素(和proGDF11)的切割通过前体蛋白转化酶如Furin/PACE3(偶合基本氨基酸裂解酶3)或PCSK5(前体蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 5型)进行,其切开前结构域和成熟生长因子之间的保守RXXR位点。这一切割产生潜伏复合物,其中成熟生长因子被前结构域屏蔽而不与其受体结合。参见图3B,其显示蛋白酶的潜在抑制,从而阻断原肌生长抑制素的进一步切割。激活和活性生长因子的释放通过来自BMP/tolloid家族的另外的蛋白酶如TLL-2(Tolloid-样蛋白2)或BMP1(骨形态发生蛋白1)在切割后完成。

[0122] 图4显示亲本Ab1抗体和其它候选者在基于细胞中的报告分析中的性能。在用来自前体蛋白转化酶和tolloid蛋白酶家族两者的酶的过夜蛋白水解反应后,成熟生长因子的释放在293T细胞中使用基于CAGA的报告试验测量。结果与对照反应相比以计算在该试验中释放的原肌生长抑制素或proGDF11的分数。显示了3个重复的 averages 的标准差,但对于大多数数据点由于其低幅度而在曲线图上不可见。

[0123] 图5图示地显示Ab1、Ab2、Ab4和Ab6抗体不抑制proGDF11激活。

[0124] 图6显示评估平均百分体重变化的试验的结果。动物每日称重且计算从第0日的百分重量变化。数据表示组平均值±SEM。在研究的第42天各组的平均百分变化数据相对于PBS对照组使用单因素ANOVA接着Holm-Sidak's后验检验进行分析,**p<0.01。

[0125] 图7A-7D显示评估组织重量的试验的结果。图7A显示平均腓肠肌重量。图7B显示平均胸肌重量。图7C显示平均比目鱼肌重量。图7D显示平均三头肌重量。统计学评估相对于溶剂对照组(组1)使用单因素ANOVA接着Holm-Sidak's后验检验进行。数据表示组平均值±SEM。**p<0.01。棒从左至右指示组1-5。

[0126] 图8A-8C显示评估组织重量的试验的结果。图8A显示平均胫骨前肌重量。图8B显示平均膈肌重量。图8C显示平均四头肌重量。统计学评估相对于溶剂对照组(组1)使用单因素ANOVA接着Holm-Sidak's后验检验进行。数据表示组平均值±SEM。*p<0.05。棒从左至右指示组1-5。

[0127] 图9A-9B显示评估平均百分体重和瘦体重变化的试验的结果。图9A是显示在整个研究过程中每周两次称重的动物中所计算的从第0天的百分重量变化的曲线图。在图9B中,动物经历EchoMRI(QNMR)以测量第-4、7、14、21和28天的身体组成,并计算从第0天的百分瘦体重变化。数据表示组平均值±SEM。对于体重和瘦体重两者,在研究的第28天各组的平均百分变化数据相对于IgG对照组(组2)使用单因素ANOVA接着Holm-Sidak's后验检验进行分析。***p<0.0005,**p<0.005,*p<0.05,ns(不显著)。

[0128] 图10A-10D是显示评估肌肉重量的试验结果的曲线图。图10A显示平均四头肌重量,图10B显示平均腓肠肌重量,图10C显示平均胫骨前肌重量,和图10D显示平均膈肌重量。

Ab1处理组与IgG对照组相比的平均肌肉重量的百分差异标明在各棒上方。统计学评估相对于IgG对照组(组2)使用单因素ANOVA接着Holm-Sidak's后验检验进行。数据表示组平均值 \pm SEM。**** $p<0.0001$,*** $p<0.0005$,** $p<0.005$,* $p<0.05$,ns(不显著)。

[0129] 图11A-11B显示评估平均百分体重和瘦体重变化的试验的结果。图11A显示从在整个研究过程中每周两次称重的动物计算的从第0天的百分重量变化。(图11B)动物经历EchoMRI(QNMR)以测量第-1、6和13天的身体组成,并计算从第-1天的百分瘦体重变化。PBS=磷酸盐缓冲盐水,Dex=地塞米松,IgG(20)=以20mg/kg/wk给药的IgG对照抗体,Ab1(20)=以20mg/kg/wk给药的Ab1抗体,和Ab1(2)=以2mg/kg/wk给药的Ab1抗体。数据表示组平均值 \pm SEM。在第14天(对于体重)和第13天(对于瘦体重)各组的平均百分变化数据相对于组1使用单因素ANOVA接着Dunnett's多重比较检验进行分析(**** $p<0.0001$,*** $p<0.0005$,** $p<0.005$,* $p<0.05$)且相对于组5使用单因素ANOVA接着Dunnett's多重比较检验进行分析(+++ $p<0.0001$,+++ $p<0.0005$,++ $p<0.005$,+ $p<0.05$)。ns(不显著)。

[0130] 图12A-12D是显示评估不同肌肉的重量的试验结果的曲线图。图12A显示平均腓肠肌重量(克),图12B显示平均四头肌重量(克),图12C显示相对于用PBS(IP)和正常饮水处理的对照动物(组1)的平均百分腓肠肌重量变化,和图12D显示相对于用PBS(IP)和正常饮水处理的对照动物(组1)的平均百分四头肌重量变化。PBS=磷酸盐缓冲盐水,Dex=地塞米松,IgG(20)=以20mg/kg/wk给药的IgG对照抗体,Ab1(20)=以20mg/kg/wk给药的Ab1抗体,和Ab1(2)=以2mg/kg/wk给药的Ab1抗体。对于图12A-12B,误差棒代表标准差(SD)。对于图12C-12D,误差棒代表平均值的标准误差(SEM)。统计学评估相对于组1(**** $p<0.0001$,*** $p<0.0005$,** $p<0.005$,* $p<0.05$)和相对于组5(+++ $p<0.0001$,+++ $p<0.0005$,++ $p<0.005$,+ $p<0.05$)使用单因素ANOVA接着Dunnett's多重比较检验进行。ns(不显著)。棒从左至右指示PBS,水;PBS,dex;IgG对照;Ab1(20);和Ab1(2)。

[0131] 图13A-13B显示评估平均百分体重和瘦体重变化的试验的结果。图13A显示对于在整个研究过程中每周两次称重的动物计算的从第0天的百分重量变化。图13B显示从经历EchoMRI(QNMR)以测量第-1、7和14天的身体组成的动物计算的从第-1天的百分瘦体重变化。PBS=磷酸盐缓冲盐水,IgG(20)=以20mg/kg/wk给药的IgG对照抗体,Ab1(20)=以20mg/kg/wk给药的Ab1抗体,和Ab1(2)=以2mg/kg/wk给药的Ab1抗体。数据表示组平均值 \pm SEM。

[0132] 图14A-14D显示评估肌肉重量的试验的结果。图14A显示打石膏的腿的平均腓肠肌重量(克),图14B显示打石膏的腿的平均四头肌重量(克),图14C显示相对于用PBS(IP)处理且未打石膏的对照动物(组1)的平均百分腓肠肌重量变化,和图14D显示相对于用PBS(IP)处理且未打石膏的对照动物(组1)的平均百分四头肌重量变化。PBS=磷酸盐缓冲盐水,IgG(20)=以20mg/kg/wk给药的IgG对照抗体,Ab1(20)=以20mg/kg/wk给药的Ab1抗体,和Ab1(2)=以2mg/kg/wk给药的Ab1抗体。对于图14A-14B,误差棒代表标准差(SD)。对于图14C-14D,误差棒代表平均值的标准误差(SEM)。统计学评估相对于组1(**** $p<0.0001$,*** $p<0.0005$,** $p<0.005$,* $p<0.05$)和相对于组5(+++ $p<0.0001$,+++ $p<0.0005$,++ $p<0.005$,+ $p<0.05$)使用单因素ANOVA接着Dunnett's多重比较检验进行。ns(不显著)。棒从左至右指示PBS,无石膏;PBS,打石膏;IgG对照(2),打石膏;Ab1(20),打石膏;和Ab1(2),打石膏。

[0133] 图15显示评估第21天(右上)和第28天(左上)的瘦体重变化的试验的结果。它还描

述了在测试抗体的三个不同剂量(20mg/kg/wk(左下)、2mg/kg/wk(中下)和0.5mg/kg/wk(右下))、PBS对照和IgG对照下瘦体重的百分变化。统计学评估相对于组1(**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)和相对于IgG对照使用单因素ANOVA接着Dunnett's多重比较检验进行。对于上方的两幅图,棒从左至右是:PBS; IgG Ctrl 20mg/kg/wk; Ab1 20mg/kg/wk; Ab1 2mg/kg/wk; Ab1 0.5mg/kg/wk; Ab2 20mg/kg/wk; Ab2 2mg/kg/wk; Ab2 0.5mg/kg/wk; Ab4 20mg/kg/wk; Ab4 2mg/kg/wk; Ab4 0.5mg/kg/wk; Ab6 20mg/kg/wk; Ab6 2mg/kg/wk; 和 Ab6 0.5mg/kg/wk。对于左下图(20mg/kg/wk),对应于给药后第28天的数据点从上至下对应于Ab1、Ab4、Ab2、Ab6、IgG对照和PBS。对于中下图(2mg/kg/wk),对应于给药后第28天的数据点从上至下对应于Ab2、Ab1、Ab6、Ab4、IgG对照和PBS。对于右下图(0.5mg/kg/wk),对应于给药后第28天的数据点从上至下对应于IgG对照Ab1、Ab2、PBS、Ab4和Ab6。

[0134] 图16A-16B显示肌生长抑制素前体形式的域结构和评估。图16A显示原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的域结构,指明了蛋白酶切割位点。图16B显示在SDS PAGE凝胶上运行的部分前体蛋白转化酶切割的原肌生长抑制素。在还原条件下,蛋白质条带由原肌生长抑制素单体(~50kD)、前结构域(~37kD)和生长因子(12.5kD)组成。

[0135] 图17A-17B显示Ab1对于肌生长抑制素是特异性的。图17A显示Ab1特异性地结合原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素,没有观察到与TGFB超家族的其它成员的结合,最显著地GDF11的对应形式。Ab1以高浓度(50ug/mL)施用于用所示抗原涂覆的Forte-Bio BLI尖端且测量结合和解离速率以获得近似Kd值。生物传感器反应(指示结合事件)的幅度通过黑色棒图表示,且计算的Kd以橙色表明。图17B显示Ab1阻断原肌生长抑制素的激活,但不阻断proGDF11的激活。在用来自前体蛋白转化酶和tolloid蛋白酶家族两者的酶的过夜蛋白水解反应后,成熟生长因子的释放在293T细胞中使用基于CAGA的报告试验测量。结果与对照反应相比以计算在该试验中释放的原肌生长抑制素或proGDF11的分数。

[0136] 图18A-18C显示候选抗体的SCID剂量反应。图18A显示腓肠肌的肌肉重量和图18B显示四头肌的肌肉重量。图18C显示与PBS对照相比的平均肌肉重量的百分变化。图18A-18B中的棒从左至右是:PBS; IgG Ctrl 20mg/kg/wk; Ab1 20mg/kg/wk; Ab1 2mg/kg/wk; Ab1 0.5mg/kg/wk; Ab2 20mg/kg/wk; Ab2 2mg/kg/wk; Ab2 0.5mg/kg/wk; Ab4 20mg/kg/wk; Ab4 2mg/kg/wk; Ab4 0.5mg/kg/wk; Ab6 20mg/kg/wk; Ab6 2mg/kg/wk; 和 Ab6 0.5mg/kg/wk。

[0137] 图19显示将Ab1与现有肌生长抑制素抗体(AbMyo)相比的作用持续时间研究的结果。PBS用作阴性对照; IgG用作阳性对照。瘦体重变化在21天后在不同给药方案下检验。

[0138] 图20是说明体外重建肌生长抑制素激活的试验的示意图。

[0139] 图21A-21B显示具有置换丝氨酸的脯氨酸的IgG4亚型的人源化单克隆抗体(Ab2)的重链(图21A; SEQ ID NO:50)和轻链(图21B; SEQ ID NO:51)。这产生了IgG1-样铰链序列且最小化链间二硫桥(其是IgG4的特征)的不完全形成。互补决定区(CDR)加下划线。黑体的NST序列:N-连接的糖基化共有序列位点;黑体的DP序列是潜在切割位点;黑体的NX序列,其中X可以是S、T或G,是潜在脱酰胺位点;黑体的DX序列,其中X可以是G、S、T或SDG,是潜在异构化位点;黑体的甲硫氨酸是潜在甲硫氨酸氧化位点;黑体的Q是预期的N-末端焦谷氨酸。

[0140] 图22是显示通过种系化(germlining)降低的免疫原性风险的示意图。24H4(WT)在框架区内包含5个非种系氨基酸,如在示意图中表明的。

[0141] 图23A-23C显示Ab1的优化。选择特异性地结合原肌生长抑制素的优化候选者,得

到数十个具有提高的亲合力的克隆。进行FACS以显示与Ab1 (图23A) 相比酵母克隆 (图23B) 的增加了的结合。图23C显示亲和力成熟的变体也具有通过octet的较慢的解离速率。

[0142] 图24A-24B显示亲本Ab1与亲和力优化的变体Ab3和Ab5的重链可变区 (图24A) 和轻链可变区 (图24B) 的序列比对。序列标识从上至下对应于SEQ ID NO:24、26、28 (图24A)。序列标识从上至下对应于SEQ ID NO:30、32、34 (图24B)。互补决定区 (CDR) 使用Kabat (下划线) 和IMGT命名法 (黑体) 定义。相对于亲本Ab1的置换以浅灰色显示。

[0143] 图25显示在来自正常和肌肉萎缩的小鼠的肌肉和血浆中原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素的表达。

[0144] 图26显示肌肉和血浆中原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的变化。棒从左至右显示原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素、原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素。

[0145] 图27显示Ab2独特地识别原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素,从而结合血清和肌肉两者中的肌生长抑制素的主要形式。前结构域 (深灰色) 和成熟生长因子 (浅灰色) 的非还原蛋白质印迹。重组原肌生长抑制素 (rProMyostatin) 显示原肌生长抑制素和肌生长抑制素前结构域 (潜伏肌生长抑制素) 在凝胶上的迁移,其通过箭头突出显示。在血清中,Ab2和AbMyo两者结合潜伏肌生长抑制素 (前结构域条带) 及多种部分加工的前体,但是仅Ab2识别原肌生长抑制素 (上条带)。在肌肉中,Ab2沉淀原肌生长抑制素,而在肌肉组织中没有AbMyo与原肌生长抑制素的相互作用。

[0146] 图28A-28B提供正常和萎缩肌肉中肌生长抑制素流的模型。在正常肌肉中 (图28A),原肌生长抑制素在肌肉中产生并通过Furin蛋白酶 (其可以在细胞内或细胞外存在) 的切割转化成潜伏肌生长抑制素。肌肉中某些部分的潜伏肌生长抑制素然后释放到循环中,从而形成潜伏肌生长抑制素的循环池。在肌肉萎缩中 (图28B),活性肌生长抑制素生长因子的增加通过肌肉中原肌生长抑制素水平的上调和潜伏肌生长抑制素至活性生长因子的转化增加而引起。结果,循环潜伏肌生长抑制素随着潜伏肌生长抑制素的肌肉池通过mTLL2切割重定向至形成成熟肌生长抑制素而减少。

[0147] 图29显示来自给药的大鼠的血清中Ab2 (上部线) 和IgG对照 (下部线) 抗体的检测。Ab2显示出与IgG对照相比在循环中升高的水平,在研究结束时血清中具有平均17.1 μ g/ml的Ab2。Ab2水平使用已知量的用作参比标准的各抗体通过人IgG-特异性ELISA测定。

[0148] 图30A-30B显示在处理的大鼠中Ab2的药效学作用。图30A显示用Ab2处理的大鼠表现出与PBS-或IgG对照-处理的动物相比增加的瘦体重。Ab2和IgG在第0天以10mg/kg剂量静脉内施用。瘦体重在给药后7、14、21和28天通过qNMR测量 (N=8/组)。图30B显示股直肌和胫骨前肌 (tibialis anterior) 在研究结束时从所有组收集 (N=8/组) 并称重以测定肌肉质量。用Ab2处理的大鼠分别显示出股直肌和胫骨前肌肌肉质量的14%和11%的增加。

[0149] 图31A-31B显示Ab2处理的大鼠中的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素水平。图31A显示Ab2的处理 (上部线) 提高大鼠血清中潜伏肌生长抑制素水平~20-倍。图31B显示在大鼠肌肉 (股直肌) 中,Ab2处理导致肌生长抑制素的潜伏形式1.9x的增加。棒从左至右对应于原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素、原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素。在大鼠肌肉中没有观察到原肌生长抑制素的统计学显著的变化。这些数据来自n=3样品/组的定量蛋白质印迹分析。

[0150] 图32显示Ab2的处理 (Ab2) 或比较抗体的处理 (AbMyo) 早在抗体给药后7天导致增加的瘦体重。瘦体重的增加直到给药后21天对于Ab2和AbMyo是等同的。但是,到给药后28天,瘦体重的增加在AbMyo-处理组中丧失,而Ab2-处理组中的增加在整个研究期间保持。上部线对应于Ab2,中间线对应于AbMyo,和下部线对应于IgG对照 (5mg/kg)。

[0151] 图33显示在单个5mg/kg剂量的Ab2 (上部线) 或比较抗体 (AbMyo; 下部线) 后,药物的血清水平使用抗-人IgG ELISA测量。药物早在给药后1小时在血清中检测到,且两种抗体的 $>1\mu\text{g/ml}$ 的水平可以在整个研究中检测到。但是,Ab2表现出比AbMyo显著更长的半衰期和推断的曲线下面积 (AUCINF),表明在相似的剂量下,Ab2表现出比AbMyo显著更高的暴露量。

[0152] 图34显示血清肌生长抑制素使用荧光蛋白质印迹在药物处理的小鼠中和在对照中测量。尽管具有增加的Ab2血清暴露,血清潜伏肌生长抑制素水平在Ab2-和AbMyo-处理小鼠两者中是相似的。这些数据表明游离药物的循环水平相对于靶标的水平足够过量,使得增加的Ab2的血清暴露不导致循环潜伏肌生长抑制素与在AbMyo组中观察到的相比增加更多。数据组从左至右对应于IgG、Ab2、AbMyo、IgG、Ab2和AbMyo。

[0153] 图35A-35B显示潜伏肌生长抑制素和原肌生长抑制素的相对水平通过荧光蛋白质印迹在小鼠肌肉溶解产物中测量。图35A显示潜伏肌生长抑制素在Ab2-和AbMyo-处理肌肉两者中升高。但是,潜伏肌生长抑制素的升高在AbMyo-处理肌肉中到第28天返回到基线,而Ab2处理肌肉中的那些保持升高直到至少这一时间 ($P<0.003$, 相对于AbMyo处理)。图35B显示对于原肌生长抑制素观察到相似的趋势,尽管在第28天时Ab2和AbMyo处理组之间的差异不是统计学显著的 ($P=0.068$)。

[0154] 图36A显示Ab2的处理对小鼠中肌肉质量和功能的作用。

[0155] 图36B显示Ab2的处理对小鼠中的最大力产生 (maximal force generation) 的作用。

具体实施方式

[0156] 肌生长抑制素是TGF β 超家族的成员,并属于包括两个成员的亚家族:肌生长抑制素 (也称为GDF8) 和GDF11。如同TGF β 超家族的其它成员,肌生长抑制素和GDF11最初都表达为无活性的前体多肽 (分别称为原肌生长抑制素和proGDF11)。结构域结构和命名显示于图1A中。图1B显示原肌生长抑制素的总体结构的卡通模型,其中成熟生长因子保持锁定在由通过称为“潜伏套索 (latency lasso)”的环连接的两个 α 螺旋组成的笼中。

[0157] 成熟生长因子的激活和释放通过几个离散的蛋白酶切割事件完成,其概述在图2中。原肌生长抑制素和proGDF11的第一切割步骤通过前体蛋白转化酶进行,其在前结构域和成熟生长因子之间的保守RXXR位点处切割。这一切割产生潜伏复合体,其中成熟生长因子通过前结构域屏蔽而不与其受体结合。成熟的、活性肌生长抑制素生长因子的激活和释放在通过来自BMP/tolloid家族的另外的蛋白酶如mTLL-2切割后完成 (图2)。

[0158] 人、大鼠、小鼠和食蟹猴中的示例性proGDF8序列在下面提供。在这些proGDF8序列中,前体蛋白转化酶切割位点以黑体指示和tolloid蛋白酶位点通过加下划线指示。在一些实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点包含SEQ ID NO:52-55的氨基酸残基240-243。在一些实施方式中,tolloid蛋白酶位点包含SEQ ID NO:52-55的氨基酸残基74-75。应当理解,本文中提供的示例性proGDF8序列不旨在是限制性的,且来自其它物种的另外的proGDF8序

列(包括其任何异形体)在本公开的范围內。

[0159] proGDF8(人):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETA
PNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDDYHATT
ETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR
PVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSID
[0160] VKTVLQNWLLKQPESNLGIEIKALDENGHDLA VTFPGPGEDGLNPF
LEVKVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD
WIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCT
PTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 52).

[0161] proGDF8(大鼠):

NEDSEREANVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRLETA
PNISKDAIRQLLPAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDDYHATT
ETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR
AVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSID
[0162] VKTVLQNWLLKQPESNLGIEIKALDENGHDLA VTFPGPGEDGLNPF
LEVKVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD
WIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCT
PTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 53).

[0163] proGDF8(小鼠):

NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRLETA
PNISKDAIRQLLPAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDDYHATT
ETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLR
PVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSID
[0164] VKTVLQNWLLKQPESNLGIEIKALDENGHDLA VTFPGPGEDGLNPF
LEVKVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD
WIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCT
PTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 54).

[0165] proGDF8(食蟹猴):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETA
PNISKDAIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDDYHATT
ETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAKLWIYLR
[0166] PVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSID
VKTVLQNWVKQPEPNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPF
LEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWD
WIIA (SEQ ID NO: 55).

[0167] 肌生长抑制素和GDF11在其成熟生长因子结构域之间共有相对高的保守性水平,具有90%的同一性,但在其前结构域区域中保守性低得多,在这两者之间具有低于50%的氨基酸同一性。肌生长抑制素和GDF11结合由与II型受体 (ACTRIIA/B) 结合的I型受体 (ALK4/5) 组成的相同受体并通过其发信号。肌生长抑制素与I型和II型受体的啮合启动导致SMAD磷酸化和肌肉萎缩基因的转录激活的信号传导级联。成熟生长因子中相对高的保守性水平使得鉴定可以区分成熟肌生长抑制素和GDF11的试剂如单克隆抗体成为挑战。

[0168] 在一些实施方式中,本文中提供了特异性地结合嵌合构建体的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体,该嵌合构建体包含生长因子结构域和GDF11的N末端前肽部分和GDF8的前肽的C末端部分。这一嵌合构建体(如以下示出的)称为GDF11Arm8。

[0169] >GDF11Arm8 (SEQ ID NO:65)

[0170] MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLVDYKDDDDKHHHHHLEVLFGPAEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERS
RPAPSVAPDPGCPVCVWRQHSRELRLSISQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSD
GSLEDDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAKLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPM
KDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNWVKQPEPNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEV
KVTDTPKRSRRNLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRG
SAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGCS

[0171] 肌生长抑制素在肌病中的作用

[0172] 骨骼肌占到体重的大约40%且是动态器官,以每天1-2%的速率更新。肌肉萎缩是在失用期间(例如,失用性萎缩)和/或响应于升高的系统性炎症(恶病质)而发生的高度调控的分解代谢过程。在失用性萎缩(其可以在延长的固定期中如在卧床期间发生)中,肌肉损失快速发生。例如,在一周的住院期中,患者平均损失~1.3kg的肌肉质量。

[0173] 肌肉萎缩在广泛的临床状况中引起显著的病态。在去神经支配疾病如肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)或脊髓性肌萎缩(SMA)及遗传性疾病包括肌肉萎缩症中,肌肉强度和功能的损失是高度失能性的临床表现,对于其没有足够的治疗。在由于肾衰竭、AIDS、心脏病或癌症导致的恶病质综合征中,肌肉萎缩通常损害原发病症的成功治疗。肌肉损失也由天然的老化过程导致,且在其最严重的形式中,分类为肌肉减少症,一种在老年人中普遍的情况,这日益公认为需要干预的病理。最后,肌肉萎缩的主要驱动因素是失用。固定不动在一大类病症如髌骨折、选择性关节置换、脊髓损伤、危重病肌病和中风中引起快速和显著的肌肉损失。尽管其病因是变化的,这些适应症共有肌肉虚弱的特征,其导致严重的残疾、漫长的身体康复和恢复时间及生活质量受损。

[0174] 在肌肉萎缩病症中存在着未满足的医学需求。因此,在一些实施方式中,本文提供了用于治疗肌肉萎缩的方法。在一些实施方式中,本文提供的方法涉及原发性肌病的治疗。在一些实施方式中,本文提供的方法涉及继发性肌病(其中肌肉损失继发于疾病病理的病症)的治疗,如,例如,去神经支配的疾病、遗传性肌无力和恶病质。在一些实施方式中,本文提供的用于治疗原发性肌病如失用性萎缩(例如,与髌骨折或脊髓损伤(SCI)相关的)的方法导致受试者中肌肉质量、强度和功能的提高。

[0175] 肌生长抑制素途径抑制

[0176] 在针对肌肉相关病症治疗的临床开发的各个阶段中存在着几种肌生长抑制素途径拮抗剂。这样的途径拮抗剂靶向成熟生长因子或其II型受体,且大多数拮抗多个TGF β 家族成员的信号传导。例如,多种当前的临床候选物阻断另外的生长因子,如激活素A、GDF11及BMP9和10,其分别是生殖生物学、伤口愈合、红细胞生成和血管生成的调节剂。本公开的方面涉及阻断除肌生长抑制素之外的这些因子将由于不可接受的副作用而潜在地限制可以安全地进行治疗的患者群体的认识。

[0177] 因此,本文提供了能够结合原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素(由此抑制肌生长抑制素活性)的抗体,及其用于治疗与肌病相关的疾病和障碍的用途。在一些实施方式中,鉴于潜伏复合物在循环中的普遍性,本文中提供了特异性地靶向更丰富的和更长寿命的肌生长抑制素前体(例如,原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素)而非成熟生长因子的治疗。不希望局限于任何特定理论,本文中提供的抗体可以防止原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素蛋白水解激活成能够激活肌生长抑制素途径(例如,通过结合I型(ALK4/5)和II型(ACTRIIA/B)受体)的成熟肌生长抑制素(其被认为是肌生长抑制素的“活性”形式)。

[0178] 如本文中使用的,术语“原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素”是指原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素或两者。在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体特异性地结合原肌生长抑制素。在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体特异性地结合潜伏肌生长抑制素。在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体特异性地结合潜伏肌生长抑制素和原肌生长抑制素两者。应理解,“潜伏肌生长抑制素”和“原肌生长抑制素”也可以在本文中分别称为“潜伏GDF8”和“proGDF8”。

[0179] 如本文中使用的,术语“成熟肌生长抑制素”是指肌生长抑制素的成熟的生物活性形式。在一些实施方式中,成熟肌生长抑制素能够实现肌生长抑制素受体结合和/或激活。成熟肌生长抑制素在体内从其原-肌生长抑制素形式的激活和释放通过几个单独地蛋白酶切割事件完成。首先,“原-肌生长抑制素”被前体蛋白转化酶切割,产生“潜伏-肌生长抑制素”,其中成熟肌生长抑制素被前结构域的一部分屏蔽而不与其受体结合。成熟肌生长抑制素的激活和释放在潜伏肌生长抑制素通过来自BMP/tolloid家族的另外的蛋白酶如mTLL-2的切割后完成。参见,例如,图1A、1B和2。如本文中使用的,术语“成熟肌生长抑制素”可以指全长成熟肌生长抑制素以及保留生物学活性的全长成熟肌生长抑制素的片段两者。示例性的成熟肌生长抑制素序列、其变体和生成成熟肌生长抑制素的方法在本领域中是公知的且更详细地描述于本文中。

[0180] 术语“原肌生长抑制素”,也称为“proGDF8”,是指成熟肌生长抑制素的无活性形式,其包含二硫键连接的同型二聚体,该同型二聚体的各分子包含与羧基末端成熟肌生长抑制素结构域共价结合的氨基末端前结构域。在一个实施方式中,“原肌生长抑制素”未被

前体蛋白转化酶或来自BMP/tolloid家族的蛋白酶切割。示例性的原肌生长抑制素序列、其变体和生成原肌生长抑制素的方法在本领域中是公知的且更详细地描述于本文中。

[0181] 如本文中使用的,术语“潜伏肌生长抑制素”是指成熟肌生长抑制素的无活性前体,其包含二硫键连接的同型二聚体,该同型二聚体的各分子包含与羧基末端成熟肌生长抑制素结构域非共价结合的氨基末端前结构域。在一个实施方式中,“潜伏肌生长抑制素”从已被前体蛋白转化酶切割,但未被来自BMP/tolloid家族的蛋白酶切割的原肌生长抑制素产生。在另一实施方式中,“潜伏肌生长抑制素”可以通过在体外组合前结构域和羧基末端成熟肌生长抑制素结构域并允许它们正确地折叠而产生。参见,例如,Sengle等, *J. Biol. Chem.*, 286 (7):5087-5099, 2011。示例性的潜伏肌生长抑制素序列、其变体和生成潜伏肌生长抑制素的方法在本领域中是公知的且更详细地描述于本文中。

[0182] 如本文中使用的,术语“原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素”是指原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素或者原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素两者。在一个实施方式中,本文公开的抗体结合原肌生长抑制素。在另一实施方式中,本文公开的抗体结合潜伏肌生长抑制素。在另一实施方式中,本文公开的抗体结合原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素。

[0183] 如本文中使用的,术语“纯原肌生长抑制素”或“纯pro-GDF8”是指包含原-肌生长抑制素的组合物,其不含或基本上不含其它形式的肌生长抑制素如潜伏肌生长抑制素和成熟肌生长抑制素。在一个实施方式中,本文公开的抗体特异性地结合纯原肌生长抑制素。换句话说,这样的抗体结合缺乏其它形式的肌生长抑制素(myostatin),潜伏肌生长抑制素和成熟肌生长抑制素的组合物中的原肌生长抑制素。

[0184] 如本文中使用的,术语“前体蛋白转化酶切割位点”是指其中原肌生长抑制素被前体蛋白转化酶切割的位点。在一个实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点是前结构域和生物活性结构域或成熟肌生长抑制素之间的保守的RXXR位点。参见,例如,图1A、1B和2。

[0185] 如本文中使用的,术语“BMP/tolloid蛋白酶家族切割位点”是指其中潜伏肌生长抑制素被BMP/tolloid蛋白酶家族成员切割的位点。在一个实施方式中,BMP/tolloid蛋白酶家族成员是mTLL-2。参见,例如,图1A、1B和2。

[0186] 结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体

[0187] 本公开至少部分地基于某些原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素特异性抗体(例如,本文中称为Ab1的抗体)阻止原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素蛋白水解激活成为成熟肌生长抑制素的意外发现。此外,使用这样的抗体抑制肌生长抑制素激活在地塞米松和石膏诱导的肌肉萎缩小鼠模型中有效地增加肌肉质量。本公开的方面提供了结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素并抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素蛋白水解激活成为成熟肌生长抑制素的抗体(例如,抗体和抗原结合片段)。

[0188] 抗体(可以复数形式互换使用)是能够通过至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区中的抗原识别位点特异性地结合靶标(如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文中使用的,术语“抗体”不仅涵盖完整的(例如,全长)多克隆或单克隆抗体,而且包括其抗原结合片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及包含具有所需特异性的抗原识别位点的任何其它修饰构型的免疫球蛋白分子,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰抗体。抗体包括任何

种类的抗体,如IgD、IgE、IgG、IgA或IgM(或其亚类),且抗体不需要是任何特定种类。取决于抗体重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分配到不同种类。具有五个主要的免疫球蛋白种类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且这些种类中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于免疫球蛋白的不同种类的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。

[0189] 如本文中使用的“分离的抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的分离的抗体基本上不含特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素之外的抗原的抗体)。但是,特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的分离的抗体可以具有与其它抗原如来自其它物种的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素分子的交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学品。

[0190] 如本文中使用的术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体及其片段。本公开的人抗体可以包括非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR和特别地CDR3中。但是,如本文中使用的术语“人抗体”不旨在包括其中源自另一哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列被嫁接到人框架序列上的抗体。

[0191] 术语“表位”包括能够特异性地结合免疫球蛋白或T-细胞受体的任何多肽决定子。在某些实施方式中,表位决定子包括分子的化学活性表面群组,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,且在某些实施方式中,可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。表位是被抗体结合的抗原区域。在某些实施方式中,当抗体优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原时其被称为特异性结合抗原。

[0192] 本文所述的抗体能够结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素,从而抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素蛋白水解激活成为成熟肌生长抑制素。在一些情况中,本文所述的抗体可以抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解激活至少20%,例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些情况中,本文所述的抗体可以抑制前体蛋白转化酶(例如,弗林蛋白酶)对原肌生长抑制素的蛋白水解切割至少20%,例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些情况中,本文所述的抗体可以抑制tolloid蛋白酶(例如,mTLL2)对原肌生长抑制素或潜伏肌生长抑制素的蛋白水解切割至少20%,例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的抑制性活性可以通过常规方法测量,例如,通过如实施例1和图3中所描述的蛋白质印迹分析。但是,应理解,另外的方法可以用于测量抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体对原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解切割的抑制性活性。在一些实施方式中,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素切割(例如,通过前体蛋白转化酶和/或tolloid蛋白酶)的抑制可以反映为抑制常数(K_i),其提供拮抗剂效能的度量,且其是降低蛋白酶活性(例如,前体蛋白转化酶或tolloid蛋白酶的活性)一半所需的拮抗剂(例如,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体)的浓度且不依赖于酶或底物浓度。

[0193] 在一些实施方式中,前体蛋白转化酶包含(i)水解包含前体蛋白转化酶切割位点的蛋白质的肽键的催化结构域,和(ii)结合具有前体蛋白转化酶切割位点的rTGF的结合口

袋。根据本公开使用的前体蛋白转化酶的实例包括,但不限于PCSK5/6、PACE4、PACE7和PACE3(例如,弗林蛋白酶)。在一些实施方式中,前体蛋白转化酶获自任何哺乳动物,包括但不限于人、猴或啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)。

[0194] 在一些实施方式中,前体蛋白转化酶与选自以下的前体蛋白转化酶是同源的:PCSK5/6、PACE4、PACE7和PACE3(例如,弗林蛋白酶)。例如,前体蛋白转化酶可以与PCSK5/6、PACE4、PACE7或PACE3(例如,弗林蛋白酶)至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同、至少99%相同、至少99.5%相同或至少约99.9%相同。

[0195] 在一些实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点是可以通过前体蛋白转化酶(例如,PCSK5/6、PACE4、PACE7和PACE3)切割的氨基酸序列。在一些实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点包含氨基酸序列R-X-X-R,其中R是精氨酸和X是任何氨基酸。在一些实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点包含氨基酸序列R-X-(K/R)-R,其中R是精氨酸,K是赖氨酸和X是任何氨基酸。在一些实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点包含氨基酸序列R-V-R-R(SEQ ID NO:57),其中R是精氨酸和V是缬氨酸。对于人、大鼠、小鼠和食蟹猴肌生长抑制素的示例性前体蛋白转化酶切割位点在SEQ ID NO:52-55中以黑体显示。在一些实施方式中,前体蛋白转化酶切割位点包含氨基酸序列RSRR(SEQ ID NO:56)。

[0196] 在一些实施方式中,根据本公开使用的tolloid蛋白酶包括,但不限于BMP-1、mTLL-1和mTLL-2。tolloid蛋白酶可以获自任何哺乳动物,包括但不限于人、猴或啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)。在一些实施方式中,tolloid蛋白酶与选自以下的tolloid蛋白酶是同源的:BMP-1、mTLL-1和mTLL-2。例如,tolloid蛋白酶可以与BMP-1、mTLL-1和mTLL-2至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同、至少99%相同、至少99.5%相同或至少约99.9%相同。

[0197] 在一些实施方式中,tolloid蛋白酶切割位点是可以通过tolloid(例如,BMP-1、mTLL-1和mTLL-2)切割的氨基酸序列。对于人、大鼠、小鼠和食蟹猴肌生长抑制素的示例性tolloid蛋白酶切割位点在SEQ ID NO:52-55中加下划线显示。在一些实施方式中,tolloid切割位点包含氨基酸序列QR,其中Q是谷氨酰胺和R是精氨酸。

[0198] 在一些实施方式中,本文所述的抗体能够结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素,从而抑制肌生长抑制素活性。在一些情况中,本文所述的抗体可以抑制肌生长抑制素信号传导至少20%,例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方式中,肌生长抑制素信号传导的抑制可以通过常规方法测量,例如,使用如实施例1中所述的肌生长抑制素激活分析。但是,应理解,另外的方法可以用于测量肌生长抑制素信号传导活性。

[0199] 应理解,肌生长抑制素通过,例如,前体蛋白转化酶和/或tolloid蛋白酶的蛋白水解切割的程度可以使用任何合适的方法测量和/或定量。在一些实施方式中,肌生长抑制素的蛋白水解切割的程度使用酶联免疫吸附分析(ELISA)测量和/或定量。例如,ELISA可以用于测量释放的生长因子(例如,成熟肌生长抑制素)的水平。作为另一实例,特异性地结合原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素和/或成熟肌生长抑制素的抗体可以用于ELISA中以测量肌生长抑制素的特定形式(例如,原/潜伏/成熟-肌生长抑制素)的水平,以定量肌生长抑制素的蛋白水解切割的程度。在一些实施方式中,肌生长抑制素的蛋白水解切割的程度使用

免疫沉淀接着胰蛋白酶肽的SDS-PAGE或质谱、基于各向异性荧光的技术、FRET分析、氢-氘交换质谱和/或NMR谱来测量和/或定量。

[0200] 在一些实施方式中,抗体,也称为免疫球蛋白,是由各大约25kDa的两条轻链(L)和各大约50kDa的两条重链(H)构成的四聚糖基化蛋白质。抗体中可以发现两种类型的轻链,称为 λ 和 κ 。取决于重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分配到五个主要种类:A、D、E、G和M,且这些中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。各轻链通常包括N-末端可变(V)结构域(V_L)和恒定(C)结构域(C_L)。各重链通常包括N-末端V结构域(V_H)、三个或四个C结构域(C_H1-3)和铰链区。最接近于V_H的C_H结构域命名为C_H1。V_H和V_L结构域由称为框架区的相对保守序列的四个区(FR1、FR2、FR3和FR4)(其形成用于超变序列的三个区(互补决定区,CDR)的骨架)组成。CDR包含大多数负责抗体与抗原的特异性相互作用的残基。CDR称为CDR1、CDR2和CDR3。因此,重链上的CDR成分称为CDRH1、CDRH2和CDRH3,而轻链上的CDR成分称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。CDR通常指Kabat CDR,如Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services(1991),eds.Kabat等中所述的。用于表征抗原结合位点的另一标准是指由Chothia描述的超变环。参见,例如,Chothia,D.等(1992)J.Mol.Biol.227:799-817;和Tomlinson等(1995)EMBO J.14:4628-4638。再另一标准是Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用的AbM定义。一般参见例如,Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.In:Antibody Engineering Lab Manual(Ed.:Duebel,S和Kontermann,R.,Springer-Verlag,Heidelberg)。针对Kabat CDR描述的实施方式可以替代地使用相对于Chothia超变环或AbM-定义中环或者这些方法中的任何组合所述的相似关系实施。

[0201] 在一些实施方式中,本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体和编码抗体的本公开的核酸分子包括表1中所示的CDR氨基酸序列。

[0202] 表1.

[0203]

抗体	CDRH1 (SEQ ID NO: 1-3)	CDRH2 (SEQ ID NO: 4-9)	CDRH3 (SEQ ID NO: 10-11)	CDRL1 (SEQ ID NO: 12-17)	CDRL2 (SEQ ID NO: 18-21)	CDRL3 (SEQ ID NO: 22-23)
Ab1 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 2)	VISYDGSNKYY ADSVKG (SEQ ID NO: 4) ISYDGSN (SEQ ID NO: 5)	DLLVRFLEWSH YYGMDV (SEQ ID NO: 10)	SGSSSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 12) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 13)	SDNQRPS (SEQ ID NO: 18) SDN (SEQ ID NO: 19)	AAWDDSLNGV (SEQ ID NO: 22)
Ab3 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSIKYYA DSVKG (SEQ ID NO: 6) ISYDGSI (SEQ ID NO: 7)	DLLVRFLEWSH KYGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSTSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 14) TSNIGSNT (SEQ ID NO: 15)	SDDQRPS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)
Ab5 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGNNKYY ADSVKG (SEQ ID NO: 8) ISYDGNN (SEQ ID NO: 9)	DLLVRFLEWSH KYGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSSSNIGGNTV H (SEQ ID NO: 16) SSNIGGNT (SEQ ID NO: 17)	SDDQRPS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)

[0204] 在表1中,CDRH3和CDRL3的单一序列反映Kabat和IMGT。

[0205] 在一些实施方式中,本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合剂(例如,抗体)包括任何抗体(包括抗原结合片段),其包括CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3,或者其组合,如对于表1中所示的任一抗体提供的。在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合剂包括表1中所示的任一抗体的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3。本公开也包括编码包含如对于表1中所示的任一抗体提供的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3的分子的任何核酸序列。抗体重链和轻链CDR3结构域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中可以发挥特别重要的作用。因此,本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合剂或其核酸分子可以包括如表1中所示的抗体的至少重链和/或轻链CDR3。

[0206] 本公开的方面涉及结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素蛋白且包含六个互补决定区(CDR):CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的单克隆抗体或抗原结合片段。

[0207] 在一些实施方式中,CDRH1包含如SEQ ID NO:1-3中任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRH2包含如SEQ ID NO:4-9中任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRH3包含如SEQ ID NO:10-11中任一所示的序列。CDRL1包含如SEQ ID NO:12-17中任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRL2包含如SEQ ID NO:18-21中任一所示的序列。在一些实施方式中,CDRL3包含如SEQ ID NO:22-23中任一所示的序列。

[0208] 在一些实施方式中(例如,对于表1中所示的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体Ab1),CDRH1包含如SEQ ID NO:1或2中所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:4或5中所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:10中所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:12或13中所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:18或19中所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:22中所示的序列,且抗体结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。

[0209] 在一些实施方式中(例如,对于表1中所示的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体Ab3),CDRH1包含如SEQ ID NO:1或3中所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:6或7中所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:11中所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:14或15中所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:20或21中所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:23中所示的序列,且抗体结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。

[0210] 在一些实施方式中(例如,对于如表1中所示抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体Ab5),CDRH1包含如SEQ ID NO:1或3中所示的序列,CDRH2包含如SEQ ID NO:8或9中所示的序列,CDRH3包含如SEQ ID NO:11中所示的序列,CDRL1包含如SEQ ID NO:16或17中所示的序列,CDRL2包含如SEQ ID NO:20或21中所示的序列,和CDRL3包含如SEQ ID NO:23中所示的序列,且抗体结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一些实例中,任何本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合剂(例如,抗体)包括具有与CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和/或CDRL3基本上相似的一个或多个CDR(例如,CDRH或CDRL)序列的任何抗体(包括抗原结合片段)。例如,抗体可以包括与SEQ ID NO:1-23中任一中的对应CDR区相比包含最多5、4、3、2或1个氨基酸残基变异的如表1中所示的一个或多个CDR序列(SEQ ID NO:1-23)。表1中所列抗体的重链可变区和轻链可变区的完整氨基酸和核酸序列在下面提供。

[0211] 重链可变区-Ab1亲本

[0212] QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF

TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:24)

[0213] CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (SEQ ID NO:38)

[0214] 重链可变区 -Ab2种系

[0215] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:25)

[0216] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (SEQ ID NO:39)

[0217] 重链可变区 -Ab3亲本

[0218] QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGMVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:26)

[0219] CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATATGATGGAAGTATCAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGACAAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (SEQ ID NO:40)

[0220] 重链可变区 -Ab4种系

[0221] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGMVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:27)

[0222] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATATGATGGAAGTATCAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGACAAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (SEQ ID NO:41)

[0223] 重链可变区 -Ab5亲本

[0224] QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNKYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGMVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:28)

[0225] CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG

GCAGTTATATCATATGATGGAAATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TCTCCTGGTGCGATTTTGGAGTGGTCGCACAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (SEQ ID NO:42)

[0226] 重链可变区 -Ab6种系

[0227] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNKYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGM DVWVGQT TVTVSS (SEQ ID NO:29)

[0228] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATATGATGGAAATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TCTCCTGGTGCGATTTTGGAGTGGTCGCACAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (SEQ ID NO:43)

[0229] 轻链可变区 -Ab1亲本

[0230] QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFVGGGTKLTVL (SEQ ID NO:30)

[0231] CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTT
TGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTC
ATCTATAGTGATAATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCC
TGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGGGT
GTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:44)

[0232] 轻链可变区 -Ab2种系

[0233] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFVGGGTKLTVL (SEQ ID NO:31)

[0234] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTT
TGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTC
ATCTATAGTGATAATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCC
TGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGGGT
GTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:45)

[0235] 轻链可变区 -Ab3亲本

[0236] QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDES LNVFVGGGTKLTVL (SEQ ID NO:32)

[0237] CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTT
TGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTC
ATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCC
TGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGT
GTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:46)

[0238] 轻链可变区 -Ab4种系

[0239] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKS

GTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)

[0240] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:47)

[0241] 轻链可变区 - Ab5亲本

[0242] QPVLTPPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDQRPSPVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:34)

[0243] CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:48)

[0244] 轻链可变区 - Ab6种系

[0245] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDQRPSPVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:35)

[0246] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:49)

[0247] Ab2-重链

[0248] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRLEDTAIVYYCARDLLVRFLEWSHYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPSNTKVKDKRVESKYGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:50)

[0249] Ab2-轻链

[0250] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSPVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:51)

[0251] 在一些实施方式中,本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体包括包含SEQ ID NO:24-29任一的重链可变域或SEQ ID NO:30-35任一轻链可变域的任何抗体。在一些实施方式中,本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体包括包含SEQ ID NO:24和30;25和31;26和32;27和33;28和34;或29和35的重链可变域和轻链可变域对的任

何抗体。

[0252] 本公开的方面提供了具有与本文所述任何重链可变和/或轻链可变氨基酸序列同源的重链可变和/或轻链可变氨基酸序列的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体。在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体包含与SEQ ID NO:24-29中任一的重链可变序列或SEQ ID NO:30-35中任一的轻链可变序列至少75%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)相同的重链可变序列或轻链可变序列。在一些实施方式中,同源重链可变和/或轻链可变氨基酸序列在本文提供的任何CDR序列内不改变。例如,在一些实施方式中,序列变异的程度(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)可以存在于除本文提供的任何CDR序列以外的重链可变和/或轻链可变序列中。

[0253] 两个氨基酸序列的“百分同一性”使用如Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990的算法(在Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993中改进的)确定。这种算法整合在Altschul等 J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)中。BLAST蛋白检索可以用XBLAST程序,评分=50,字长=3进行以获得与目标蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在空位的情况中,带空位BLAST可以如Altschul等,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所述使用。当采用BLAST和带空位BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0254] 在一些实施方式中,保守突变可以在如基于晶体结构确定的残基不太可能参与与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的相互作用的位置处引入CDR或框架序列中。如本文中使用的,“保守氨基酸置换”是指不改变进行氨基酸置换的蛋白质的相对电荷和大小特征的氨基酸置换。变体可以按照本领域技术人员已知用于改变多肽序列的方法制备,如在汇编这样的方法的参考文献中发现的,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual, J.Sambrook等,eds.,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989,或Current Protocols in Molecular Biology, F.M.Ausubel等,eds.,John Wiley&Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守置换包括在以下组中的氨基酸之间进行的置换:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0255] 在一些实施方式中,本文中提供的抗体包含对抗体赋予所需性质的突变。例如,为避免由于Fab-臂交换(其已知对于原始IgG4 mAb发生)导致的潜在并发症,本文中提供的抗体可以包含稳定的‘Adair’突变(Angal S.等,“A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4)抗体”,Mol Immunol 30,105-108;1993),其中丝氨酸228(EU编号;残基241Kabat编号)转换为脯氨酸,导致IgG1-样(CPPCP(SEQ ID NO:58))铰链序列。因此,任何抗体可以包括稳定的‘Adair’突变或氨基酸序列CPPCP(SEQ ID NO:58)。

[0256] 本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合剂可以任选地包含抗体恒定区或其部分。例如, V_L 结构域可以在其C-末端连接于轻链恒定域如 C_{κ} 或 C_{λ} 。类似地, V_H 结构域或其部分可以连接于重链的全部或部分,如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,及任何同种型亚类。抗体可以包括合适的恒定区(参见,例如,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,No.91-3242,National Institutes of Health Publications,

Bethesda, Md. (1991))。因此,本公开范围内的抗体可以包括与任何合适的恒定区组合的 V_H 和 V_L 结构域或其抗原结合部分。

[0257] 在某些实施方式中, V_H 和/或 V_L 结构域可以恢复为种系序列,例如,这些结构域的FR使用常规分子生物学技术突变以匹配通过种系细胞产生的那些。例如, V_H 和/或 V_L 结构域可以分别恢复为IgHV3-30 (SEQ ID NO:36) 和/或IgLV1-44 (SEQ ID NO:37) 的种系序列。应理解,任何 V_H 和/或 V_L 结构域可以恢复为任何合适的种系序列。在其它实施方式中,FR序列保持相异于共有种系序列。

[0258] IgHV3-30

[0259] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:36)

[0260] IgLV1-44

[0261] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG (SEQ ID NO:37)

[0262] 在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体或抗原结合片段可以包括或不包括SEQ ID NO:24-35所示的抗体的框架区。在一些实施方式中,抗-原-潜伏肌生长抑制素抗体是鼠抗体且包括鼠框架区序列。

[0263] 在一些实施方式中,本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体可以以相对高的亲和力结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素,例如,以低于 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 或更低的 K_d 结合。例如,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体可以以5pM和500nM之间,例如,50pM和100nM之间,例如,500pM和50nM之间的亲和力结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。本公开也包括与本文所述的任何抗体竞争结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素且具有50nM或更低(例如,20nM或更低、10nM或更低、500pM或更低、50pM或更低或者5pM或更低)的亲和力的抗体或抗原结合片段。抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的亲和力和结合动力学可以使用任何合适的方法测试,包括但不限于生物传感器技术(例如,OCTET或BIAcore)。

[0264] “特异性结合”靶抗原的抗体以比其与非靶抗原结合更高的亲和力、亲合力结合靶抗原,更容易与靶抗原结合,和/或与靶抗原结合更长的时间。在一些实施方式中,本文公开了特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的tolloid切割位点处或附近或者tolloid对接位点处或附近。在一些实施方式中,如果抗体结合在tolloid切割位点或tolloid对接位点的15个或更少氨基酸残基内,则抗体结合在tolloid切割位点附近或tolloid对接位点附近。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在tolloid切割位点或tolloid对接位点的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸残基内。在一些实施方式中,抗体结合在GDF8的tolloid切割位点处或附近。例如,抗体可以结合SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列PKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT (SEQ ID NO:62)。在其它实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的前体蛋白转化酶切割位点处或附近或者前体蛋白转化酶对接位点处或附近。在一些实施方式中,如果抗体结合在前体蛋白转化酶切割位点或前体蛋白转化酶对接位点的15个或更少氨基酸残基内,抗体结合在前体蛋白转化酶切割位点附近或前体蛋白转化酶对接位点附近。在

一些实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在前体蛋白转化酶切割位点或前体蛋白转化酶对接位点的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸残基内。在一些实施方式中,抗体结合在GDF8的前体蛋白转化酶切割位点处或附近。例如,抗体可以结合SEQ ID NO: 63中所示的氨基酸序列GLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRC (SEQ ID NO:63)。

[0265] 在一个实例中,本文所述的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体与其它形式的肌生长抑制素和/或生长因子的TGF β 家族的其它成员相比特异性地结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。生长因子的TGF β 家族的成员包括,但不限于AMH、ARTN、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8A、BMP8B、GDF1、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF3A、GDF5、GDF6、GDF7、GDF8、GDF9、GDNF、INHA、INHBA、INHBB、INHBC、INHBE、LEFTY1、LEFTY2、NODAL、NRTN、PSPN、TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3蛋白。这样的抗体可以以与生长因子的TGF β 家族的其它成员相比高得多的亲和力(例如,至少2-倍、5-倍、10-倍、50-倍、100-倍、200-倍、500-倍或1,000-倍高)结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一些实施方式中,这样的抗体可以以与生长因子的TGF β 家族的其它成员相比高至少1,000的亲和力结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一些实施方式中,本文中提供的抗体可以以与一种或多种形式的GDF11或成熟肌生长抑制素相比高得多的亲和力(例如,至少2-倍、5-倍、10-倍、50-倍、100-倍、200-倍、500-倍或1,000-倍高)结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在一些实施方式中,本文中提供的抗体可以以与一种或多种形式的GDF11(例如,proGDF11、潜伏GDF11或成熟GDF11)或成熟肌生长抑制素相比高至少1,000的亲和力结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。或者或另外地,抗体可以表现出与TGF β 家族的其它成员如原/潜伏GDF11相比高得多(例如,至少2-倍、5-倍、10-倍、50-倍、100-倍、200-倍、500-倍、1,000-倍高)的针对原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解切割(例如,通过前体蛋白转化酶或tolloid蛋白酶)的抑制性活性。

[0266] 在一些实施方式中,抗体结合抗原但不能有效地从血浆消除抗原。因此,在一些实施方式中,血浆中抗原的浓度可以通过减少抗原的清除而提高。但是,在一些实施方式中,本文提供的抗体(例如,清扫抗体)具有对pH敏感的对抗原的亲和力。这样的pH敏感抗体在中性pH下与血浆中的抗原结合且在酸性内体中与抗原解离,因此减少抗体-介导的抗原累积和/或促进抗原从血浆清除。

[0267] 本公开的方面涉及清扫抗体。如本文中使用的,“清扫抗体”是指具有pH-敏感的抗原结合和在中性或生理pH下与细胞表面新生Fc受体(FcRn)的至少阈值水平的结合两者的抗体。在一些实施方式中,清扫抗体在中性pH下结合新生Fc受体FcRn。例如,清扫抗体在7.0-7.6范围的pH下结合FcRn。在一些实施方式中,清扫抗体可以在抗原结合位点处结合抗原和通过抗体的Fc部分结合细胞FcRn。在一些实施方式中,清扫抗体然后可以中和,从而在酸性内体中释放抗原,其可以被降解。在一些实施方式中,不再与抗原结合的清扫抗体然后通过细胞释放(例如,通过胞吐)返回到血清中。

[0268] 在一些实施方式中,(例如,受试者的)血管内皮中的FcRn延长清扫抗体的半衰期。在一些实施方式中,血管内皮细胞中和清扫抗体,其一些实施方式中结合抗原如肌生长抑制素(例如,原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素或激发的(primed)肌生长抑制素)。在一些实施方式中,清扫抗体再循环到血流中。在一些实施方式中,清扫抗体与其常规对应物相比具有增加的半衰期(例如,在受试者的血清中)。在一些实施方式中,清扫抗体的常规对应

物是指清扫抗体所衍生(例如,在对常规抗体的Fc部分工程化而在pH 7下以更高的亲和力结合之前)的抗体。在一些实施方式中,清扫抗体在受试者的血清中具有与其常规对应物相比长至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、35%、50%、75%、100%、150%、200%或250%的半衰期。

[0269] 在一些实施方式中,清扫抗体的Fc部分结合FcRn。在一些实施方式中,清扫抗体的Fc部分在pH 7.4下以 10^{-3}M - 10^{-8}M 范围的Kd结合FcRn。在一些实施方式中,清扫抗体在pH 7.4下以 10^{-3}M - 10^{-7}M , 10^{-3}M - 10^{-6}M , 10^{-3}M - 10^{-5}M , 10^{-3}M - 10^{-4}M , 10^{-4}M - 10^{-8}M , 10^{-4}M - 10^{-7}M , 10^{-4}M - 10^{-6}M , 10^{-4}M - 10^{-5}M , 10^{-5}M - 10^{-8}M , 10^{-5}M - 10^{-7}M , 10^{-5}M - 10^{-6}M , 10^{-6}M - 10^{-8}M , 10^{-6}M - 10^{-7}M 或 10^{-7}M - 10^{-8}M 范围的Kd结合FcRn。在一些实施方式中,FcRn结合于清扫抗体的CH2-CH3铰链区。在一些实施方式中,FcRn结合与蛋白A或蛋白G相同的区域。在一些实施方式中,FcRn结合与Fc γ R不同的结合位点。在一些实施方式中,清扫抗体Fc区的氨基酸残基AA是与FcRn结合所需要的。在一些实施方式中,清扫抗体Fc区的氨基酸残基AA影响与FcRn的结合。

[0270] 在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体经工程化而以较高亲和力结合FcRn。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体经工程化而在pH 7.4下以较高亲和力结合FcRn。在一些实施方式中,清扫抗体对FcRn的亲和力提高以与其常规对应物相比扩展其药代动力学(PK)性质。例如,在一些实施方式中,清扫抗体由于其在较低剂量下的功效而引起较少的副反应。在一些实施方式中,清扫抗体以较低频率施用。在一些实施方式中,清扫抗体转胞吞到某些组织类型增加。在一些实施方式中,清扫抗体增强经胎盘递送的效率。在一些实施方式中,清扫抗体以较低成本产生。

[0271] 在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体经工程化而以较低亲和力结合FcRn。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体经工程化而在pH 7.4下以较低亲和力结合FcRn。在一些实施方式中,清扫抗体对FcRn的亲和力降低以与其常规对应物相比缩短其药代动力学(PK)性质。例如,在一些实施方式中,对于成像和/或放射免疫疗法,清扫抗体更快地清除。在一些实施方式中,清扫抗体作为自身免疫性疾病的治疗促进内源病原性抗体的清除。在一些实施方式中,清扫抗体降低不良妊娠结果(其可以通过母源的胎儿特异性抗体的经胎盘转运引起)的风险。

[0272] 在一些实施方式中,清扫抗体在与中性或生理pH(例如,pH 7.4)相比的低pH下具有对于抗原的降低的亲和力。在一些实施方式中,清扫抗体在与生理pH(例如,pH 7.4)相比的酸性pH(例如,5.5-6.5范围的pH)下具有对于抗原的降低的亲和力。应理解,本文中提供的任何抗体可以经工程化以根据pH的变化与抗原解离(例如,pH敏感抗体)。在一些实施方式中,本文中提供的清扫抗体经工程化以根据pH结合抗原。在一些实施方式中,本文中提供的清扫抗体经工程化以根据pH结合FcRn。在一些实施方式中,本文中提供的清扫抗体通过胞吞内化。在一些实施方式中,本文提供的清扫抗体通过FcRn结合内化。在一些实施方式中,胞吞的清扫抗体在内体中释放抗原。在一些实施方式中,清扫抗体重循环回到细胞表面。在一些实施方式中,清扫抗体保持连接于细胞。在一些实施方式中,胞吞的清扫抗体重循环回到血浆。应理解,本文中提供的任何抗体的Fc部分可以工程化以具有不同的FcRn结合活性。在一些实施方式中,FcRn结合活性影响抗原被清扫抗体的清除时间。在一些实施方式中,清扫抗体可以是长效或速效的清扫抗体。

[0273] 在一些实施方式中,将常规治疗抗体转化成清扫抗体降低了有效剂量。在一些实

施方式中,将常规治疗抗体转化成清扫抗体降低有效剂量至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方式中,将常规治疗抗体转化成清扫抗体降低有效剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、50倍或100倍。

[0274] 在一些实施方式中,选择用于治疗清扫抗体的适宜剂量可以经验地进行。在一些实施方式中,高剂量的清扫抗体可以饱和FcRn,导致稳定血清中的抗原而不内化的抗体。在一些实施方式中,低剂量的清扫抗体可能不是治疗有效的。在一些实施方式中,清扫抗体一天一次、一周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每六周一次、每八周一次、每10周一次、每12周一次、每16周一次、每20周一次或每24周一次施用。

[0275] 在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体可以修饰或工程化为清扫抗体。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体可以使用任何合适的方法转化成清扫抗体。例如,用于制备清扫抗体的合适的方法之前已经在Igawa等,(2013)“Engineered Monoclonal Antibody with Novel Antigen-Sweeping Activity In Vivo”,PLoS ONE 8(5):e63236;和Igawa等,“pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality”,Biochimica et Biophysica Acta 1844(2014)1943-1950中描述;其各自的内容通过引用由此合并。但是,应当理解,用于制备本文提供的清扫抗体的方法不意味着是限制性的。因此,用于制备清扫抗体的另外的方法在本公开的范围之内。

[0276] 本公开的一些方面是基于本文中提供的任何抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的亲和力(例如,作为Kd表示的)对于pH的改变敏感的认识。在一些实施方式中,本文中提供的抗体在相对低的pH(例如,4.0-6.5范围的pH)下与相对高的pH(例如,7.0-7.4范围的pH)相比具有与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合的提高了的Kd。在一些实施方式中,本文中提供的抗体在pH为4.0-6.5时具有 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M范围的与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合的Kd。在一些实施方式中,本文中提供的抗体在pH为7.0-7.4时具有 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M范围的与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合的Kd。在一些实施方式中,本文中提供的抗体在4.0-6.5的pH下与7.0-7.4的pH相比具有至少2倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍、至少5000倍或至少10000倍高的与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合的Kd。

[0277] 在一些实施方式中,本文提供了不特异性地结合如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列内的表位的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体。在一些实施方式中,本文中提供的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体不特异性地结合与国际专利申请公开No.WO2016/098357的表2a、11a、11b或13中所述的抗体相同的表位,该国际专利申请公开于2016年6月23日且是基于2015年12月18日提交的国际专利申请No.PCT/JP2015/006323。在一些实施方式中,本文中提供的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体不竞争或不交叉竞争结合国际专利申请公开No.WO 2016/098357的表2a、11a、11b或13中所述的抗体相同的表位,该国际专利申请公开于2016年6月23日且是基于2015年12月18日提交的国际专利申请No.PCT/JP2015/006323。在一些实施方式中,本文中提供的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体不特异性地结合与包含国际专利申请公开No.WO 2016/098357的表2a、11a、11b或13中所述的VH和VL对的抗体相同的表位,该国际专利申请公开于2016年6月23日且是基于2015年12月18日提交的国际专利申请No.PCT/JP2015/006323。在一些实施方式中,本文中提供的

原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体不竞争或不交叉竞争结合与包含国际专利申请公开No.WO 2016/098357的表2a、11a、11b或13中所述的VH和VL对的抗体相同的表位,该国际专利申请公开于2016年6月23日且是基于2015年12月18日提交的国际专利申请No.PCT/JP2015/006323。

[0278] 多肽

[0279] 本公开的一些方面涉及具有选自以下的序列的多肽:SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO 29。在一些实施方式中,多肽是重链可变域。在一些实施方式中,多肽与SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO 29中所示的任一氨基酸序列至少75% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一。

[0280] 本公开的一些方面涉及具有选自以下的序列的多肽:SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO 35。在一些实施方式中,多肽是轻链可变域。在一些实施方式中,多肽与SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO 35中所示的任一氨基酸序列至少75% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一。

[0281] 与抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体竞争的抗体

[0282] 本公开的方面涉及与本文提供的任何抗体竞争或交叉竞争的抗体。如本文中使用的关于抗体的术语“竞争”意思是第一抗体以与第二抗体的结合充分相似的方式结合蛋白质(例如,潜伏肌生长抑制素)的表位,以使得第一抗体与其表位结合的结果在第二抗体的存在下与不存在第二抗体的情况下第一抗体的结合相比可检测地降低。其中第二抗体与其表位的结合也在第一抗体的存在下可检测地降低的替代方式可以是这种情况,但不必须是这种情况。也就是说,第一抗体可以抑制第二抗体与其表位的结合,而没有第二抗体抑制第一抗体与其相应表位的结合。但是,在各抗体可检测地抑制其它抗体与其表位或配体的结合(无论是相同、较大或较小的程度),抗体被称为彼此“交叉竞争”结合其相应的表位。竞争和交叉竞争的抗体两者在本公开的范围。无论这类竞争或交叉竞争发生的机制(例如,立体位阻、构象变化或者与共同表位或其部分的结合),本领域技术人员将理解,这样的竞争和/或交叉竞争抗体被包括且可以用于本文提供的方法和/或组合物。

[0283] 本公开的方面涉及与本文提供的任何抗体竞争或交叉竞争的抗体。在一些实施方式中,抗体结合在与本文提供的任何抗体相同的表位处或附近。在一些实施方式中,如果抗体结合在表位的15个或更少氨基酸残基内,则抗体结合在表位附近。在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在本文提供的任何抗体所结合的表位的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸残基内。

[0284] 在另一实施方式中,抗体以低于 10^{-6} M的抗体和蛋白质之间的平衡解离常数Kd竞争或交叉-竞争结合本文中提供的任何抗原(例如,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素)。在其它实施方式中,抗体以 10^{-11} M- 10^{-6} M范围的Kd竞争或交叉-竞争结合本文中提供的任何抗原。

[0285] 本公开的方面涉及与本文提供的任何抗体竞争结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体。在一些实施方式中,抗体在与本文提供的任何抗体相同的表位处结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。例如,在一些实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在

原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的tollid切割位点处或附近或者tollid对接位点处或附近。在其它实施方式中,本文中提供的任何抗体结合在原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的前体蛋白转化酶切割位点处或附近或者前体蛋白转化酶对接位点处或附近。在另一实施方式中,抗体以低于 10^{-6} M的抗体和原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素之间的平衡解离常数Kd竞争结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。在其它实施方式中,与本文中提供的任何抗体竞争的抗体以 10^{-11} M- 10^{-6} M范围的Kd结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。

[0286] 本文中提供的任何抗体可以使用任何合适的方法表征。例如,一种方法是鉴别抗原与其结合的表位或“表位作图”。存在着许多用于定位和表征蛋白质上的表位的合适方法,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争分析、基因片段表达分析和基于合成肽的分析,如在例如,Harlow和Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1999的第11章中所述的。在另外的实例中,表位作图可以用于确定抗体与其结合的序列。表位可以是线性表位,即包含在单一氨基酸延伸链中,或由氨基酸的三维相互作用形成的构象表位,其可能不是必然包含在单一延伸链(初级结构线性序列)中。可以分离或合成(例如,重组地)变化长度(例如,至少4-6氨基酸长)的肽且用于与抗体的结合分析。在另一实例中,抗体与其结合的表位可以通过使用源自目标抗原序列的重叠肽并测定抗体的结合在系统筛选中确定。根据基因片段表达分析,编码目标抗原的开放阅读框随机地或通过特定遗传重建片段化且测定表达的抗原片段与待测试的抗体的反应性。例如,基因片段可以通过PCR产生和然后在放射性氨基酸的存在下在体外转录和翻译成蛋白质。抗体与放射标记的抗原片段的结合然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定。某些表位也可以通过使用在噬菌体颗粒的表面上展示的随机肽序列的大文库(噬菌体文库)来鉴定。或者,重叠肽片段的限定文库可以在简单结合分析中测定与测试抗体的结合。在另外的实例中,可以进行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变以鉴定表位结合需要的、足够的和/或必要的残基。例如,结构域交换实验可以使用其中原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素多肽的各种片段已经用来自密切相关的但抗原性上不同的蛋白质(如TGFB蛋白家族的另一成员(例如,GDF11))的序列替代(交换)的目标抗原的突变体进行。通过评估抗体与突变原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的结合,可以评估特定抗原片段对抗体结合的重要性。

[0287] 或者,竞争分析可以使用已知结合相同抗原的其它抗体进行以确定是否抗体结合与其它抗体相同的表位。竞争分析是本领域技术人员公知的。

[0288] 任何合适的方法,例如,本文中所述的表位作图方法,可以应用于确定是否抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体结合本文所述的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素中的一个或多个特定残基/区段。此外,抗体与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素中的那些限定的残基中的一个或多个的相互作用可以通过常规技术测定。例如,可以确定晶体结构,且相应地可以测定原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素中的残基与抗体中的一个或多个残基之间的距离。基于这种距离,可以确定是否原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素中的特定残基与抗体中的一个或多个残基相互作用。此外,合适的方法如竞争分析和靶诱变分析可以应用于确定与另一靶标如突变原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素相比候选抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的优先结合。

[0289] 结合原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体的产生

[0290] 多种方法可以用于获得本公开的抗体或其抗原结合片段。例如,抗体可以使用重组DNA方法产生。单克隆抗体也可以通过根据已知方法生成杂交瘤(参见,例如,Kohler和Milstein(1975) *Nature*, 256:495-499)来产生。以这种方式形成的杂交瘤然后使用标准方法,如酶联免疫吸附分析(ELISA)和表面等离子体共振(例如,OCTET或BIAcore)分析,进行筛选以鉴定产生特异性地结合指定抗原的抗体的一种或多种杂交瘤。任何形式的指定抗原可以用作免疫原,例如,重组抗原、天然存在的形式、其任何变体或片段,以及其抗原性肽(例如,本文中描述为线性表位或在骨架内作为构象表位的任何表位)。制备抗体的一种示例性的方法包括筛选表达抗体或其片段(例如,scFv)的蛋白质表达文库,例如,噬菌体或核糖体展示文库。噬菌体展示描述于,例如,Ladner等,U.S.Pat.No.5,223,409;Smith(1985) *Science* 228:1315-1317;Clackson等(1991) *Nature*, 352:624-628;Marks等(1991) *J.Mol.Biol.*, 222:581-597;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690和WO 90/02809中。

[0291] 除了使用展示文库外,指定的抗原(例如,原肌生长抑制素)可以用于免疫非人动物,例如,啮齿动物,例如,小鼠、仓鼠或大鼠。在一个实施方式中,非人动物是小鼠。

[0292] 在另一实施方式中,单克隆抗体从非人动物获得,和然后使用合适的重组DNA技术修饰,例如,嵌合。用于制备嵌合抗体的多种途径已经描述。参见例如,Morrison等, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:6851, 1985;Takeda等, *Nature* 314:452, 1985;Cabilly等, U.S.Pat.No.4,816,567;Boss等, U.S.Pat.No.4,816,397;Tanaguchi等, 欧洲专利公开EP171496;欧洲专利公开0173494, 英国专利GB 2177096B。

[0293] 对于另外的抗体产生技术,参见 *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds.Harlow等, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。本公开不必然限制于任何特定的来源、生产方法或其它特殊的抗体特征。

[0294] 本公开的一些方面涉及用多核苷酸或载体转化的宿主细胞。宿主细胞可以是原核或真核细胞。存在于宿主细胞中的多核苷酸或载体可以整合到宿主细胞的基因组中或其可以保持在染色体外。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,如细菌、昆虫、真菌、植物、动物或人细胞。在一些实施方式中,真菌细胞是,例如,酵母属的那些,特别是酿酒酵母种的那些。术语“原核的”包括可以用DNA或RNA分子转化或转染用于表达抗体或相应的免疫球蛋白链的所有细菌。原核宿主可以包括格兰氏阴性以及格兰氏阳性细菌如,例如,大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、粘质沙雷氏菌和枯草芽胞杆菌。术语“真核的”包括酵母、高等植物、昆虫和脊椎动物细胞,例如,哺乳动物细胞,如NSO和CHO细胞。取决于重组体产生过程中使用的宿主,多核苷酸编码的抗体或免疫球蛋白链可以糖基化或可以是非糖基化的。抗体或相应的免疫球蛋白链也可以包括起始甲硫氨酸氨基酸残基。

[0295] 在一些实施方式中,一旦载体已经被并入适宜宿主中,宿主可以维持在适合于核苷酸序列的高水平表达的条件下,且按照需要,可以进行免疫球蛋白轻链、重链、轻/重链二聚体或完整抗体、抗原结合片段或其它免疫球蛋白形式的收集和纯化;参见Beychok, *Cells of Immunoglobins Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979)。因此,多核苷酸或载体引入细胞中,其随后产生抗体或抗原结合片段。此外,包含前述宿主细胞的转基因动物,优选哺乳动物,可以用于抗体或抗体片段的大规模生产。

[0296] 转化的宿主细胞可以在发酵器中生长并使用任何合适的技术培养以获得最佳细胞生长。一旦表达,全抗体、其二聚体、单个轻链和重链、其它免疫球蛋白形式或抗原结合片段可以按照本领域的标准过程纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、凝胶电泳等等;参见 Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)。抗体或抗原结合片段然后可以从生长培养基、细胞裂解产物或细胞膜部分分离。例如,细菌表达的抗体或抗原结合片段的分离和纯化可以是任何常规的方式,如,例如,制备性色谱分离和免疫分离,如涉及使用针对例如抗体的恒定区的单克隆或多克隆抗体的那些。

[0297] 本公开的方面涉及杂交瘤,其提供无限延长的单克隆抗体来源。作为直接从杂交瘤的培养物获得免疫球蛋白的替代方式,永生化的杂交瘤细胞可以用作用于后续表达和/或遗传操作的重排的重链和轻链基因座的来源。重排的抗体基因可以从适宜的mRNA反转录以产生cDNA。在一些实施方式中,重链恒定区可以与不同同种型的重链恒定区交换或一起消除。可变区可以连接以编码单链Fv区。多个Fv区可以连接以赋予对超过一个靶标的结合能力或者可以采用嵌合的重链和轻链组合。任何适宜的方法可以用于抗体可变区的克隆和重组抗体的生成。

[0298] 在一些实施方式中,获得编码重链和/或轻链的可变区的适宜核酸并插入可以转染到标准重组宿主细胞中的表达载体中。可以使用多种这样的宿主细胞。在一些实施方式中,哺乳动物宿主细胞对于高效的加工和生产可能是有利的。可用于这一目的的典型哺乳动物细胞系包括CHO细胞、293细胞或NS0细胞。抗体或抗原结合片段的产生可以通过在适合于宿主细胞的生长和编码序列的表达的培养条件下培养修饰的重组宿主来进行。抗体或抗原结合片段可以通过将其从培养物分离来回收。表达系统可以设计为包括信号肽以使得所得抗体分泌到培养基中;但是,细胞内产生也是可能的。

[0299] 本公开还包括编码本文所述的抗体的至少免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸。在一些实施方式中,该多核苷酸编码的可变区包含通过上述任一杂交瘤产生的抗体可变区的VH和/或VL的至少一个互补决定区(CDR)。

[0300] 编码抗体或抗原结合片段的多核苷酸可以是,例如,DNA、cDNA、RNA或者合成产生的DNA或RNA,或者包含单独或组合的任何这些多核苷酸的重组产生的嵌合核酸分子。在一些实施方式中,多核苷酸是载体的部分。这样的载体可以包含允许在合适的宿主细胞中和合适的条件下选择载体的进一步的基因,如标记基因。

[0301] 在一些实施方式中,多核苷酸操作性地连接表达控制序列而允许在原核或真核细胞中表达。多核苷酸的表达包括多核苷酸转录成可翻译的mRNA。确保在真核细胞,优选哺乳动物细胞中的表达的调控元件是本领域技术人员公知的。它们可以包括促进转录起始的调控序列及促进转录终止和转录物的稳定的聚-A信号。另外的调控元件可以包括转录以及翻译增强子和/或天然相关的或异源的启动子区域。允许在原核宿主细胞中表达的可能的调控元件包括,例如,大肠杆菌中的PL、Lac、Trp或Tac启动子,且允许在真核宿主细胞中表达的调控元件的实例是酵母中的AOX1或GAL1启动子或者在哺乳动物和其它动物细胞中的CMV-启动子、SV40-启动子、RSV-启动子(劳氏肉瘤病毒)、CMV-增强子、SV40-增强子或球蛋白内含子。

[0302] 除了负责转录起始的元件外,这些调控元件还可以包括该多核苷酸下游的转录终止信号,如SV40-聚-A位点或tk-聚-A位点。此外,取决于所采用的表达系统,能够将多肽指

引到细胞区室或将其分泌到培养基中的先导序列可以添加到多核苷酸的编码序列上并已经在之前描述。先导序列与翻译、起始和终止序列,及优选地能够指导翻译的蛋白质的或其部分分泌到例如细胞外培养基中的先导序列以适当的相组装。任选地,可以使用编码包括赋予所需特性(例如,表达的重组产物的稳定或简化的纯化)的C-或N-末端鉴别肽的融合蛋白的异源多核苷酸序列。

[0303] 在一些实施方式中,编码轻链和/或重链的至少可变域的多核苷酸可以编码两个免疫球蛋白链或仅一个免疫球蛋白链的可变域。同样地,多核苷酸可以在相同启动子的控制下或可以单独地控制用于表达。此外,一些方面涉及载体,特别地常规地用于遗传工程中的质粒、粘粒、病毒和噬菌体,其包含编码抗体或抗原结合片段的免疫球蛋白链的可变域的多核苷酸;任选地与编码抗体的另一免疫球蛋白链的可变域的多核苷酸结合。

[0304] 在一些实施方式中,表达控制序列作为真核启动子系统提供在能够转化或转染真核宿主细胞的载体中,但也可以使用用于原核宿主的控制序列。源自病毒如逆转录病毒、牛痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可以用于递送多核苷酸或载体到目标细胞群体中(例如,以对细胞工程化而表达抗体或抗原结合片段)。多种适宜的方法可用于构建重组病毒载体。在一些实施方式中,多核苷酸和载体可以重构到脂质体中用于递送到目标细胞。包含多核苷酸(例如,免疫球蛋白链的重链和/或轻链可变域的编码序列和表达控制序列)的载体可以通过合适的方法转移到宿主细胞中,该方法根据细胞宿主的类型而变化。

[0305] 修饰

[0306] 本公开的抗体或抗原结合片段可以用可检测标记进行修饰,包括但不限于,酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、正电子发射金属、非放射性顺磁性金属离子和用于检测和分离原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的亲和标记。可检测物质可以使用合适的技术直接地与本公开的多肽偶联或缀合或者通过中间体(如,例如,接头)间接地偶联或缀合。合适的酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的非限制性实例包括链酶亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的非限制性实例包括生物素、伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁米诺;生物发光物质的非限制性实例包括荧光素酶、萤光素和水母发光蛋白;且合适的放射性物质的实例包括放射性金属离子,例如, α 发射体或其它放射性同位素如,例如,碘(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}mIn , ^{113}mIn , ^{112}In , ^{111}In)和锝(^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、钽(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga , ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{86}Rb 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 和锡(^{113}Sn , ^{117}Sn)。可检测物质可以使用合适的技术直接地与本公开的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体偶联或缀合或者通过中间体(如,例如,接头)间接地偶联或缀合。与可检测物质缀合的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体可以用于如本文中所述的诊断分析。

[0307] 药物组合物

[0308] 一种或多种抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体可以与药学上可接受的载体(赋形剂)(包括缓冲剂)混合,以形成用于缓解与肌病相关的疾病或障碍的药物组合

物。“可接受的”意思是载体必须与组合物的活性成分相容(和优选地,能够稳定活性成分)且对于所治疗的受试者不是有害的。药学上可接受的赋形剂(载体)(包括缓冲剂)的实例是本领域技术人员清楚的且之前已经描述。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins, Ed.K.E.Hoover。在一个实例中,本文所述的药物组合物包含超过一种识别目标抗原的不同表位/残基的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体。

[0309] 本发明的方法中使用的药物组合物可以包含冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。(Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins,Ed.K.E.Hoover)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,并且可以包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(低于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶蛋白或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,如钠;金属复合物(例如,锌-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,如TweenTM、PluronicTM或聚乙二醇(PEG)。药学上可接受的赋形剂在本文中进一步描述。

[0310] 在一些实例中,本文所述的药物组合物包含含有抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的脂质体,该脂质体可以通过任何合适的方法制备,如Epstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985);Hwang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980);和U.S.Pat.No.4,485,045和4,544,545中描述的。具有增加的循环时间的脂质体公开于U.S.Pat.No.5,013,556中。特别有用的脂质体可以通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物制备。脂质体通过具有限定孔隙大小的过滤器挤出以产生具有所需直径的脂质体。

[0311] 抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。示例性的技术之前已经描述,参见例如,Remington,The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.Mack Publishing(2000)。

[0312] 在其它实例中,本文所述的药物组合物可以配制成持续释放形式。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质为成形颗粒的形式,例如,膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(U.S.Pat.No.3,773,919)、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯基乙酸乙酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)、乙酸异丁酸蔗糖酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0313] 用于体内施用的药物组合物必须为无菌的。这容易地例如通过经无菌的过滤膜的

过滤来达成。治疗性抗体组合物一般置于具有无菌进入端口的容器中,例如,具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的静注溶剂袋或小瓶。

[0314] 本文所述的药物组合物可以为单位剂型如片剂、丸剂、胶囊、粉末剂、颗粒剂、溶液或悬浮液、或栓剂,用于口服、肠胃外或直肠施用,或通过吸入或吹入的施用。

[0315] 为制备固体组合物如片剂,活性成分可以与药用载体混合,例如,常规压片成分如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树脂,及其它药用稀释剂,例如,水,以形成包含本公开的化合物或其非毒性的药学上可接受的盐的均质混合物的固体预制剂组合物。当提到这些预制剂组合物为均质的时,意思是活性成分在整个组合物中均匀地分散,使得组合物可以容易地细分成同等有效的单位剂型如片剂、丸剂和胶囊。这一固体预制剂组合物然后细分成包含0.1mg至约500mg的本公开活性成分的上述类型的单位剂型。新型组合物的片剂或丸剂可以包衣或另外地复配以提供给予延长作用的优势的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内剂量和外剂量组成部分,后者为前者上的包层的形式。两个组成部分可以通过肠溶层分隔,该肠溶层用于对抗胃中的崩解并允许内组成部分完整地进入十二指肠中或延迟释放。多种材料可以用于这类肠溶层或涂层,这样的材料包括多种聚合酸和聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素的这些材料的混合物。

[0316] 合适的表面活性试剂包括,特别地,非离子试剂如聚氧乙烯山梨聚糖(例如,Tween™ 20、40、60、80或85)和其它山梨聚糖(例如,Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性试剂的组合物便利地包含0.05-5%的表面活性试剂,且可以为0.1-2.5%。应理解,如果需要,可以添加其它成分,例如甘露糖醇或其它药学上可接受的介质。

[0317] 合适的乳液可以使用商购可得的脂肪乳液如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™和Lipiphysan™制备。活性成分可以溶解在预混合的乳液组合物中或者可选地它可以溶解在油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中,且乳液在与磷脂(例如,卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合时形成。应理解,可以添加其它成分,例如甘油或葡萄糖,以调节乳液的张力。合适的乳液通常含有最多20%的油,例如,5和20%之间。

[0318] 乳液组合物可以通过混合抗-原肌生长抑制素抗体与Intralipid™或其成分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)制备的那些。

[0319] 用于吸入或吹入的药物组合物包括药学上可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液及粉末。液体或固体组合物可以包含如以上给出的合适的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,组合物通过口腔或鼻呼吸途径施用用于实现局部或系统效应。

[0320] 在优选无菌的药学上可接受的溶剂中的组合物可以通过使用气体雾化。雾化的溶液可以从雾化装置直接呼吸或雾化装置可以连接于面罩、帐幕或间歇性正压呼吸机。溶液、悬浮液或粉末组合物可以从以适宜的方式递送制剂的装置(优选经口或经鼻腔)施用。

[0321] 抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体用于治疗疾病/障碍的用途

[0322] 本文所述的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体有效地治疗与肌病相关的疾病或障碍。如本文中使用的,术语“肌病”是指其中肌纤维没有正常发挥功能的肌肉疾病,通常导致肌无力。肌病包括性质上为神经肌肉的或骨骼肌的肌肉疾病。在一些实施方式中,肌病是遗传性肌病。遗传性肌病包括,但不限于营养失调、肌强直、先天性肌病(例如,线

状体肌病、多/微核(multi/minicore)肌病和中央核肌病)、线粒体肌病、家族性周期性肌病、炎性肌病和代谢性肌病(例如,糖原贮积病和脂质贮积障碍)。在一些实施方式中,肌病是获得性肌病。获得性肌病包括,但不限于外源物质诱导的肌病(例如,药物诱导的肌病和糖皮质激素肌病、酒精性肌病及由于其它毒性剂导致的肌病)、肌炎(例如,皮肌炎、多肌炎和包涵体肌炎)、骨化性肌炎、横纹肌溶解和肌红蛋白尿症(myoglobinurias),及失用性萎缩。在一些实施方式中,肌病是失用性萎缩,其可以由骨折(例如,髌骨折)或由神经损伤(例如,脊髓损伤(SCI))引起。在一些实施方式中,肌病与如肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、脊髓性肌萎缩(SMA)、由于肾衰竭、AIDS、心脏病和/或癌症导致的恶病质综合征的疾病或障碍相关。在一些实施方式中,肌病与老化相关。

[0323] 本公开的方面包括治疗患有肌病的受试者的方法,该方法包括向受试者施用有效量的上述抗体。在一些实施方式中,肌病是原发性肌病。在另一实施方式中,原发性肌病包括失用性萎缩。在其它实施方式中,失用性萎缩与髌骨折、选择性关节置换、危重病肌病、脊髓损伤或中风相关。在一些实施方式中,肌病是继发性肌病,其中肌肉损失继发于疾病病理。在其它实施方式中,继发性肌病包括去神经支配、遗传性肌无力或恶病质。在另一实施方式中,继发性肌病是与肌萎缩性脊髓侧索硬化或脊髓性肌萎缩相关的去神经支配。在一些实施方式中,继发性肌病是与肌营养不良相关的遗传性肌无力。在其它实施方式中,继发性肌病是与肾衰竭、AIDS、心脏病、癌症或老化相关的恶病质。

[0324] 本公开的另一方面包括治疗患有与老化相关的疾病或病症的受试者的方法。与老化相关的示例性疾病或病症包括,但不限于少肌症(年龄相关的肌肉损失)、虚弱和雄激素缺乏。

[0325] 本公开的另一方面包括治疗患有与失用性萎缩/创伤相关的疾病或病症的受试者的方法。与失用性萎缩/创伤相关的示例性疾病或病症包括,但不限于与在重症监护室(ICU)中花费的时间相关的肌无力、髌/关节置换、髌骨折、中风、卧床、SCI、肩袖损伤、膝关节置换、骨折和烧伤。

[0326] 本公开的另一方面包括治疗患有神经变性疾病或病症的受试者的方法。示例性的神经变性疾病或病症包括,但不限于脊髓性肌萎缩和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)。

[0327] 本公开的另一方面包括治疗患有与恶病质相关的疾病或病症的受试者的方法。与恶病质相关的示例性疾病或病症包括,但不限于癌症、慢性心力衰竭、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、慢性阻塞性肺病(COPD)和慢性肾病(CKD)。

[0328] 本公开的另一方面包括治疗患有与罕见疾病相关的疾病或病症的受试者的方法。示例性的罕见疾病和病症包括,但不限于成骨不全症、散发性包涵体肌炎和急性淋巴细胞性白血病。

[0329] 本公开的另一方面包括治疗患有与代谢障碍和/或身体组成相关的疾病或病症的受试者的方法。在一些实施方式中,疾病或病症是肥胖症(例如,重度肥胖)、Prader-Willi、II型糖尿病或厌食症。但是,与代谢障碍和/或身体组成相关的另外的疾病或病症是本领域技术人员清楚的且在本公开的范围內。

[0330] 本公开的另一方面包括治疗患有与先天性肌病相关的疾病或病症的受试者的方法。示例性的先天性肌病包括,但不限于X-连锁肌管性肌病、常染色体显性中央核肌病、常染色体隐性中央核肌病、线状体肌病和先天性纤维型不相称性肌病。

[0331] 本公开的另一方面包括治疗患有与肌肉萎缩症相关的疾病或病症的受试者的方法。示例性的肌肉萎缩症包括,但不限于杜氏肌肉萎缩症、贝克型肌肉萎缩症、面肩胛肱型肌营养不良症(FSH)和肢带型肌营养不良症。

[0332] 本公开的另一方面包括治疗患有妇科泌尿相关疾病或病症、语言障碍(狭窄)、眼外肌病、腕管综合症、格林-巴利综合症或骨肉瘤的受试者的方法。

[0333] 为实施本文公开的方法,有效量的上述药物组合物可以通过合适的途径施用于需要治疗的受试者(例如,人),如静脉内施用,例如,浓注或一段时间内的通过连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、囊内、口服、吸入或局部途径。用于液体制剂的可商购的喷雾器,包括射流喷雾器和超声喷雾器,可用于施用。液体制剂可以直接雾化且冻干粉末可以在重构后雾化。或者,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体可以使用氟碳制剂及计量吸入器雾化,或者作为冻干和研磨粉末吸入。

[0334] 待通过本文所述的方法治疗的受试者可以是哺乳动物,更优选是人。哺乳动物包括,但不限于农畜、运动动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫、小鼠和大鼠。需要治疗的人类受试者可以是患有与肌病相关的疾病/障碍(如以上所述的那些)、处于患该疾病/障碍的风险中或疑似患有该疾病/障碍的人类患者。原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素-相关疾病或障碍的受试者可以通常日常医学检验,例如,实验室检验、器官功能测试、CT扫描或超声来鉴别。疑似患有任何这类疾病/障碍的受试者可以显示疾病/障碍的一种或多种症状。处于疾病/障碍的风险中的受试者可以是具有该疾病/障碍的一种或多种风险因子的受试者。

[0335] 如本文中使用的“有效量”是指单独地或与一种或多种其它活性剂组合地赋予受试者治疗效果所需要的各活性剂的量。如本领域技术人员公认的,有效量根据治疗的特定病症、病症的严重性、个体患者参数(包括年龄、身体状况、体形、性别和体重)、治疗持续时间、同时治疗(如果有的话)的性质、具体施用途径及健康护理者的知识和技能内的类似因素而变化。这些因素是本领域技术人员公知的且可以仅利用常规试验解决。一般优选的是使用单个组分或者其组合的最大剂量,也就是说,根据合理的医学判断的最高安全剂量。但是,本领域技术人员应理解患者出于医学原因、生理原因或出于实际上任何其它理由可以坚持较低剂量或可耐受剂量。在一些实施方式中,有效量是指足以降低或减轻障碍或者其一种或多种症状的严重性和/或持续时间、防止障碍的进展、引起障碍的消退、防止与障碍相关的一种或多种症状的复发、发展、发作或进展、检测障碍或者增强或改善另一治疗(例如,预防或治疗剂)的预防性或治疗性效应的抗体或其抗原结合部分的量。

[0336] 在一些实施方式中,在向受试者施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的情况中,有效量是与对照肌肉质量相比有效地增加受试者中目标肌肉的质量的量。在一些实施方式中,肌肉质量的增加是与对照肌肉质量相比至少1.1-倍、至少1.2-倍、至少1.3-倍、至少1.4-倍、至少1.5-倍、至少1.6-倍、至少1.7-倍、至少1.8-倍、至少1.9-倍、至少2-倍、至少4-倍、至少5-倍或更多的增加。在一些实施方式中,肌肉质量的增加是与对照肌肉质量相比在1-倍至5-倍、2-倍至10-倍、1-倍至1.5-倍、1-倍至2-倍等范围内的增加。

[0337] 如本文中使用的,术语“对照肌肉质量”是指可用于评估条件(例如,用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的处理)对受试者中的目标肌肉质量的效应的参照标准。在一些实施方式中,对照肌肉质量是预定的值。在一些实施方式中,对照肌肉质量通过实验测定。在一些实施方式中,对照肌肉质量是未施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的

受试者中目标肌肉的质量。在一些实施方式中,对照肌肉质量是未施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的受试者群体中目标肌肉的质量(例如,平均质量)。在一些实施方式中,对照肌肉质量是施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体之前(例如,正好在其之前)受试者中目标肌肉的质量。在一些实施方式中,对照肌肉质量是在代替原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体施用从未暴露于原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体所针对的抗原的动物获得的正常抗体(例如,与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体相同同种型的抗体)的受试者中目标肌肉的质量。在一些实施方式中,对照肌肉质量是代替原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体施用介质(例如,盐水)的受试者中目标肌肉的质量。

[0338] 在一些实施方式中,在对受试者施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的情况中,有效量是与对照生力能力(force generation capacity)相比有效提高受试者中目标肌肉的生力能力(例如,如用适应于横向灌注浴(horizontal perfusion bath)的肌肉杠杆系统体外测定的最大生力)的量。在一些实施方式中,生力能力的提高是与对照生力能力相比至少1.1-倍、至少1.2-倍、至少1.3-倍、至少1.4-倍、至少1.5-倍、至少1.6-倍、至少1.7-倍、至少1.8-倍、至少1.9-倍、至少2-倍、至少4-倍、至少5-倍或更多的提高。在一些实施方式中,生力能力的提高是与对照生力能力相比1-倍至5-倍、2-倍至10-倍、1-倍至1.5-倍、1-倍至2-倍等的范围内的提高。

[0339] 如本文中使用的,术语“对照生力能力”是指可用于评估条件(例如,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的处理)对受试者中肌肉的生力能力的影响的参照标准。在一些实施方式中,对照生力能力是预定的值。在一些实施方式中,对照生力能力通过实验测定。在一些实施方式中,对照生力能力是未施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的受试者中目标肌肉的生力能力。在一些实施方式中,对照生力能力是未施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的受试者群体中目标肌肉的生力能力(例如,平均生力能力)。在一些实施方式中,对照生力能力是施用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体之前(例如,正好在其之前)受试者中目标肌肉的生力能力。在一些实施方式中,对照生力能力是在已经代替原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体施用从未暴露于原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体所针对的抗原的动物获得的正常抗体(例如,与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体相同同种型的抗体)的受试者中目标肌肉的生力能力。在一些实施方式中,对照生力能力是代替原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体施用介质(例如,盐水)的受试者中目标肌肉的生力能力。

[0340] 经验考虑因素,如半衰期,一般有助于剂量的确定。例如,与人免疫系统相容的抗体,如人源化抗体或全人抗体,可以用于延长抗体的半衰期和防止抗体被宿主免疫系统攻击。施用频率可以在治疗过程中确定和调整,且一般地,但不是必然地基于与肌病相关的疾病/障碍的治疗和/或抑制和/或缓解和/或延迟。或者,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的持续连续释放制剂可以是适宜的。用于实现持续释放的各种制剂和装置对于本领域技术人员是清楚的且在本公开的范围之内。

[0341] 在一个实例中,如本文所述的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的剂量可以在已经给予一次或多次抗体施用的个体中经验地确定。个体给予拮抗剂的递增剂量。为评估拮抗剂的功效,可以追踪疾病/障碍的指标。

[0342] 一般地,对于本文所述的任何抗体的施用,初始候选剂量可以是约2mg/kg。为本公

开的目的,典型的日剂量范围可以大约为0.1 μ g/kg至3 μ g/kg至30 μ g/kg至300 μ g/kg至3mg/kg,至30mg/kg至100mg/kg或更高中的任何一种,取决于以上提及的因素。对于在几天或更长时间内的重复施用,根据病症,治疗持续直到发生所需的症状抑制或直到实现足够的治疗水平以缓解与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素相关的疾病或障碍或其症状。示例性的给药方案包括施用约2mg/kg的初始剂量,接着约1mg/kg的维持剂量的抗体,或接着每隔一周的约1mg/kg的维持剂量。但是,其它剂量方案可能是有用的,取决于实施者希望获得的药代动力学衰减模式。例如,设想一周1-4次的给药。在一些实施方式中,可以使用约3 μ g/mg-约2mg/kg(如约3 μ g/mg、约10 μ g/mg、约30 μ g/mg、约100 μ g/mg、约300 μ g/mg、约1mg/kg和约2mg/kg)范围的给药。在一些实施方式中,给药频率是每周一次、每2周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次或每10周一次;或者每月一次、每2月一次、或每3月一次、每4月一次、每5月一次、每6月一次、每8月一次、每10月一次、每年或更长。这一治疗的进展容易地通过常规技术和分析监测。给药方案(包括使用的抗体)可以随时间变化。

[0343] 在一些实施方式中,对于正常体重的成人患者,可以施用约0.3-5.00mg/kg范围的剂量。特定的剂量方案,例如剂量、时间和重复,取决于特定个体和该个体的医疗史,以及单个药剂的性质(如药剂的半衰期和其它相关考虑)。

[0344] 为本公开的目的,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的适宜剂量取决于所使用的特定抗体(或其组合物)、疾病/障碍的类型和严重性、是否抗体施用用于预防或治疗目的、之前的治疗、患者的临床史和对拮抗剂的反应及负责医师的判断。在一些实施方式中,临床医生施用抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体直到达到实现所需结果的剂量。抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的施用可以是连续的或间歇的,例如,取决于接受者的生理状况、施用目的是治疗性或预防性的及有经验的实施者已知的其它因素。抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的施用可以在预先选择的时间段内基本上是连续的或可以为一系列的间隔剂量,例如,在与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素相关的疾病或障碍发生之前、期间或之后。

[0345] 如本文中使用的,术语“治疗”是指为治愈、愈合、缓解、减轻、改变、治疗、改善、改进或影响障碍、疾病的症状或疾病/障碍的倾向的目的向具有与肌病相关的疾病/障碍、疾病/障碍的症状或发生疾病/障碍的倾向的受试者应用或施用包括一种或多种活性剂的组合物。

[0346] 减轻与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素相关的疾病/障碍包括延迟疾病的发展或进展,或者减轻疾病严重性。减轻疾病不必然需要治愈性的结果。如本文中使用的,“延迟”与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素相关的疾病/障碍的发展意味着推迟、阻碍、减缓、迟滞、稳定和/或延缓疾病的进展。这种延迟可以具有变化的时间长度,取决于病史和/或治疗的个体。“延迟”或减轻疾病的发展或者延迟疾病的发作的方法是当与未使用该方法时相比,降低在给定时间段内发生疾病的一种或多种症状的可能性和/或减轻在给定时间段内症状的程度的方法。这样的比较通常基于使用足以给出统计学显著的结果的多个受试者的临床研究。

[0347] 疾病的“发展”或“进展”意味着疾病的首表现和/或随后进展。疾病的发展可以是可检测的并使用标准临床技术评价。但是,发展也指可能不可检测的进展。为本公开的目的

的,发展或进展是指症状的生物学过程。“发展”包括发生、复发和发作。如本文中使用的,与肌病相关的疾病/障碍的“发作”或“发生”包括初发和/或复发。

[0348] 在一些实施方式中,本文所述的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体以足以在体内抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素至活性肌生长抑制素的蛋白水解激活至少20% (例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多) 的量施用于需要治疗的受试者。在其它实施方式中,抗体以有效降低原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素或潜伏肌生长抑制素水平至少20% (例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多) 的量施用。

[0349] 医学领域技术人员已知的常规方法可用于向受试者施用药物组合物,其取决于待治疗的疾病类型或疾病部位。这一组合物也可以经由其它常规途径施用,例如,口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、经鼻、口腔、阴道或经植入的储库施用。如本文中使用的术语“肠胃外”包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。另外,它可以经由积存注射施用途施用于受试者,如使用1-、3-或6-月积存注射或生物降解材料和方法。

[0350] 注射组合物可以包含各种载体如植物油、二甲基乙酰胺(dimethylacetamide)、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、乙醇和多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)。对于静脉内注射,水溶性抗体可以通过滴注法施用,从而输注包含抗体和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理上可接受的赋形剂可以包括,例如,5%右旋糖、0.9%盐水、林格氏液或其它合适的赋形剂。肌肉内制剂,例如,合适的抗体可溶性盐的无菌制剂可以在药用赋形剂如注射用水、0.9%盐水或5%葡萄糖溶液中溶解和施用。

[0351] 在一个实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体通过位点特异性的或靶向的局部递送技术施用。位点特异性的或靶向的局部递送技术的实例包括抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的各种可植入积存源或局部递送导管,如灌注导管、留置导管或针内导管、合成移植物、外膜包装(adventitial wraps)、分流器和支架或者其它可植入装置、位点特异性载体、直接注射或直接应用。参见,例如,PCT公开No. WO 00/53211和U.S. Pat. No. 5,981,568。

[0352] 包含多核苷酸或表达载体的治疗组合物的靶向递送也可以使用。受体介导的DNA递送技术描述于,例如,Findeis等,Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou等, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu等, J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu等, J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu等, J. Biol. Chem. (1991) 266:338中。

[0353] 包含多核苷酸(例如,编码本文所述的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的那些)的治疗组合物在基因治疗方案中以用于局部施用的约100ng-约200mg范围的DNA施用。在一些实施方式中,约500ng-约50mg、约1μg-约2mg、约5μg-约500μg和约20μg-约100μg的DNA或更高的浓度范围也可以在基因治疗方案期间使用。

[0354] 本文所述的治疗多核苷酸和多肽可以使用基因递送媒介递送。基因递送媒介可以是病毒或非病毒来源的(一般参见Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185和Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148)。这样的编码序列的表达可以使用内源的哺乳动物启动子和/或增强子或者异源启动子和/或增强子诱导。编码序列的表达可以是组成型的或调控

的。

[0355] 用于所需多核苷酸(例如,编码本文公开的抗体)的递送和在所需细胞中的表达的合适的病毒基载体在本公开的范围内。示例性的病毒基媒介包括,但不限于重组逆转录病毒(参见,例如,PCT公开No.WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;WO 93/11230;WO 93/10218;WO 91/02805;U.S.Pat.No.5,219,740和4,777,127;GB专利No.2,200,651;及EP专利No.0 345 242)、甲病毒基载体(例如,辛德毕斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67;ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(ATCC VR-373;ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923;ATCC VR-1250;ATCC VR 1249;ATCC VR-532))及腺相关病毒(AAV)载体(参见,例如,PCT公开No.WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655)。如Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147中所述的与灭活腺病毒连接的DNA的施用也可以使用。

[0356] 也可以使用非病毒递送媒介和方法,包括但不限于,与单独的灭活腺病毒连接或未连接的多阳离子凝聚DNA(参见,例如,Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147);配体连接的DNA(参见,例如,Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985);真核细胞递送媒介细胞(参见,例如,U.S.Pat.No.5,814,482;PCT公开No.WO 95/07994;WO 96/17072;WO 95/30763;和WO 97/42338)和核电荷中和或与细胞膜的融合。裸DNA也可以使用。示例性的裸DNA引入方法描述于PCT公开No.WO 90/11092和U.S.Pat.No.5,580,859中。可用作基因递送媒介的脂质体描述于U.S.Pat.No.5,422,120;PCT公开No.WO 95/13796;WO 94/23697;WO 91/14445;和EP专利No.0524968中。另外的途径描述于Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14:2411和Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581中。

[0357] 本文所述的方法中使用的特定剂量方案,例如,剂量、时机和重复,取决于特定的受试者和该受试者的医疗史。

[0358] 在一些实施方式中,超过一种抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体或者抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体与另一合适的治疗剂的组合可以施用于需要治疗的受试者。拮抗剂可以是相同的类型或彼此不同。抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体也可以与用于增强和/或补偿药物的效力的其它药剂结合使用。

[0359] 对于与肌病相关的疾病/障碍的治疗功效可以使用任何合适的方法评价。例如,与肌病相关的疾病/障碍的治疗功效可以通过评估肌无力(例如,评价肌无力的模式和严重性)、心电图、评估血液化学(例如,评价电解质、评价内分泌原因、测量肌酐激酶水平、测定红细胞沉降率和进行抗核抗体分析)和活检评估(例如,通过组织学、组织化学、电子显微镜、生物化学和遗传分析)来评价。

[0360] 用于缓解与肌病相关的疾病/障碍的试剂盒

[0361] 本公开还提供用于减轻与肌病相关的疾病/障碍的试剂盒。这样的试剂盒可以包括包含抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体,例如,本文所述的那些中的任一种的一个或多个容器。

[0362] 在一些实施方式中,试剂盒可以包括按照本文所述的任何方法使用的说明书。包括的说明书可以包括施用抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体以治疗目标疾病(如本文所述的那些)、延迟目标疾病的发作或缓解目标疾病的说明。试剂盒可以进一步包括选择适合于基于确定个体是否患有目标疾病的治疗的个体的说明。在再其它的实施方式中,

说明书包括向具有目标疾病的风险的个体施用抗体的说明。

[0363] 与抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的使用相关的说明书一般包括关于用于预期治疗的剂量、给药时间表和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在本公开的试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸页)上的书面说明书,但机器可读的说明书(例如,承载在磁盘或光存储盘上的说明书)也是可接受的。

[0364] 标签或包装插页表明组合物用于治疗与肌病相关的疾病或障碍、延迟其发作和/或缓解与肌病相关的疾病或障碍。说明书可以提供用于实施本文所述的任何方法。

[0365] 本公开的试剂盒在合适的包装中。合适的包装包括,但不限于小瓶、瓶子、罐子、柔性包装(例如,密封的Mylar或塑料袋)等等。还设想与特定装置如吸入器、经鼻施用装置(例如,喷雾器)或输注装置如微型泵结合使用的包装。试剂盒可以具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有通过皮下注射针可刺穿的瓶塞的小瓶)。容器也可以具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有通过皮下注射针可刺穿的瓶塞的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是如本文中所述的那些的抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体。

[0366] 试剂盒可以任选地提供另外的组分如缓冲剂和解说信息。正常情况下,试剂盒包含容器及在容器上或与容器结合的标签或包装插页。在一些实施方式中,本公开提供了包含本文所述的试剂盒的内容物的制品。

[0367] 用于检测原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的分析

[0368] 在一些实施方式中,本文提供的方法和组合物涉及用于检测从受试者获得的样品中的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的方法。如本文中使用的,“受试者”是指单个生物体,例如,单个哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者是非人哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是非人灵长动物。在一些实施方式中,受试者是啮齿动物。在一些实施方式中,受试者是绵羊、山羊、牛、猫或狗。在一些实施方式中,受试者是脊椎动物、两栖动物、爬行动物、鱼、昆虫、苍蝇或线虫。在一些实施方式中,受试者是研究动物。在一些实施方式中,受试者是遗传工程化的,例如,遗传工程化的非人受试者。受试者可以是任一性别且可以处于任何发育阶段。在一些实施方式中,受试者是患者或健康志愿者。

[0369] 在一些实施方式中,用于检测从受试者获得的样品中的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的方法包括(a)在适合于抗体与抗原结合(如果抗原存在于样品中)的条件下将样品与抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体接触,从而形成结合复合物;和(b)测定与抗原结合的抗体或抗原结合片段的水平(例如,测定结合复合物的水平)。

[0370] 如本文中使用的,结合复合物是指与抗原(例如,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素蛋白)结合的抗体(包括抗原结合片段)的生物分子复合物。结合复合物可以包含具有单一特异性的抗体或者具有不同特异性的两种或更多种抗体或抗原结合片段。在一个实施方式中,结合复合物包含识别相同抗原上的不同抗原性位点的两种或更多种抗体。在一些情况中,抗体可以与抗原结合,该抗原已经与其它生物分子如RNA、DNA、多糖或蛋白质结合。在一个实施方式中,结合复合物包含识别不同抗原的两种或更多种抗体。在一些实施方式中,结合复合物中的抗体(例如,与抗原结合的固定抗体)本身可以作为抗原与抗体(例如,可检测地标记的抗体)结合。因此,在一些情况中,结合复合物可以包含多个抗原和多个抗

体或抗原结合片段。

[0371] 结合复合物中存在的抗原可以处于或不处于其原始原位构象中。在一些实施方式中,结合复合物在抗体与纯化的蛋白质抗原或包含抗原的分离蛋白质之间形成,其中抗原不是处于其原始原位构象中。在一些实施方式中,结合复合物在抗体与纯化的蛋白质抗原之间形成,其中抗原不是处于其原始原位构象中且是固定在固体支持物(例如,PVDF膜)上。在一些实施方式中,结合复合物用抗体和例如原位地存在于原始构象中(例如,在细胞的表面上)的细胞表面蛋白形成。

[0372] 结合复合物中的抗体可以可检测地标记或不标记。在一些实施方式中,结合复合物包含可检测地标记的抗体和非标记的抗体。在一些实施方式中,结合复合物包含可检测地标记的抗原。在一些实施方式中,结合复合物中的抗体固定于一个或多个固体支持物。在一些实施方式中,结合复合物中的抗原固定于一个或多个固体支持物。示例性的固体支持物在本文中公开且对于本领域技术人员是清楚的。结合复合物的前述实例不意图是限制性的。结合复合物的其它实例对于本领域技术人员是清楚的。

[0373] 在任何检测、诊断和监测方法中,抗体(包括抗原结合片段)或抗原可以直接或间接地偶联于固体支持物表面。用于与固体支持物偶联的方法是标准的且可以通过共价和非共价相互作用完成。偶联方法的非限制性实例包括:吸附、交联、蛋白A/G-抗体相互作用和链酶亲和素-生物素相互作用。其它偶联方法对于本领域技术人员是很容易明白的。

[0374] 在一些方面中,检测、诊断和监测方法包括将与抗原(例如,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素)结合的抗体(包括抗原结合片段)的水平与一个或多个参照标准比较。参照标准可以是,例如,具有或不具有原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的受试者中的相应原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平。在一个实施方式中,参照标准是在不包含原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的样品中检测的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平(例如,背景水平)。或者,背景水平可以通过使样品与非特异性抗体(例如,从非免疫血清获得的抗体)接触从含有特定原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的样品测定。然后再次,参照标准可以是在含有原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的样品中检测的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平(例如,阳性对照)。在一些情况中,参照标准可以是与样品中原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的变化浓度相关的且可用于定量测试样品中原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的浓度的一系列水平。参照标准的前述实例不是限制性的且其它合适的参照标准对于本领域技术人员是容易明白的。在一些实施方式中,与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合的抗体的水平与成熟肌生长抑制素的水平比较。在一些情况中,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平与成熟肌生长抑制素比较以确定样品中无活性与活性肌生长抑制素的比率。

[0375] 原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平可以如本文中提供的从生物样品测量。生物样品是指可以从受试者或细胞获得的任何生物材料。例如,生物样品可以是全血、血浆、血清、唾液、脑脊液、尿液、细胞(或细胞溶解产物)或组织(例如,正常组织或肿瘤组织)。在一些实施方式中,生物样品是流体样品。在一些实施方式中,生物样品是实体组织样品。例如,组织样品可以包括,但不限于骨骼肌、心肌、脂肪组织以及来自其它器官的组织。在一些实施方式中,生物样品是活检样品。在一些实施方式中,实体组织样品可以使用本领域中的常规方法制成流体样品。

[0376] 生物样品也可以包括细胞系的一个或多个细胞。在一些实施方式中,细胞系包括人细胞、灵长类细胞(例如,vero细胞)、大鼠细胞(例如,GH3细胞、OC23细胞)或小鼠细胞(例如,MC3T3细胞)。存在多种人细胞系,包括但不限于人胚肾(HEK)细胞、HeLa细胞、来自国立癌症研究所的60癌症细胞系的癌细胞(NCI60)、DU145(前列腺癌)细胞、Lncap(前列腺癌)细胞、MCF-7(乳腺癌)细胞、MDA-MB-438(乳腺癌)细胞、PC3(前列腺癌)细胞、T47D(乳腺癌)细胞、THP-1(急性髓性白血病)细胞、U87(成胶质细胞瘤)细胞、SHSY5Y人成神经细胞瘤细胞(从骨髓瘤克隆)和Saos-2(骨癌)细胞。

[0377] 进一步的实施方式涉及用于监测患有疾病或病症或者处于其风险中的受试者的疾病、病症或其任何治疗(例如,肌病或肌病治疗)的方法,包括:(a)从受试者获得生物样品,(b)使用检测原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的抗体测定生物样品中的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平;和(c)在一种或多种时间下重复步骤(a)和(b)。肌生长抑制素已经用作肌肉萎缩的生物标志物,但是,当前可用的商业方法和试剂(例如,ELISA和蛋白质印迹中使用的抗体)或者不是对于肌生长抑制素特异性的,或者仅检测成熟肌生长抑制素或者完全不检测肌生长抑制素。因此,本文提供了用于在疾病和/或病症(例如,肌肉萎缩)的背景下检测原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素用于诊断目的的方法和试剂(例如,抗体)。作为一个实例,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平可以在受试者中或来自其的生物样品中测量以检测或监测疾病或病症的进展。作为另一个实例,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平可以在受试者中或来自其的生物样品中测量以监测对于疾病或病症的治疗的反应。应理解,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的水平可以在任何合适的时间段监测,这可以根据受试者患有的疾病或病症或者受试者可能经历的任何治疗方案而不同。

[0378] 另一实施方式涉及包含上述抗体、抗原结合片段、多核苷酸、载体或细胞中任一种及任选地用于检测的合适方式的诊断组合物。例如,抗体适合用于免疫分析中,其中它们可以在液相中使用或结合于固相载体。可以利用该抗体的免疫分析的实例是直接或间接形式的竞争性和非竞争性免疫分析。这样的免疫分析的实例是酶联免疫分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、夹心(免疫测定分析)、流式细胞分析、蛋白质印迹分析、免疫沉淀分析、免疫组织化学、免疫显微术、横向流免疫色谱分析和蛋白质组学阵列。抗原和抗体可以结合于许多不同的固体支持物(例如,载体、膜、柱、蛋白质组学阵列等)。固体支持物材料的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚偏氟乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和修饰纤维素如硝基纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。支持物的性质可以是固定的或悬浮在溶液中(例如,珠粒)。

[0379] 按照进一步的实施方式,本文提供的抗体(包括抗原结合片段)也可以用于通过从受试者获得生物样品(其可以是组织样品、血液样品或任何其它适宜的体液样品)评估受试者中的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素表达的方法中。该过程可以包括在使得能够形成抗体和抗原之间的结合复合物的条件下使血液样品(全血、血清、血浆)、组织样品或从其分离的蛋白质样品与抗体接触。这样的结合复合物的水平然后通过任何合适的方法测定。在一些实施方式中,生物样品在适合于抗体与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素蛋白(如果该抗原存在于样品中)的结合及形成由与抗原结合的抗体组成的结合复合物的条件下与抗体接触。这一接触步骤通常在反应室如管、平板孔、膜浴、细胞培养皿、显微镜载片中

进行。在一些实施方式中,抗体固定在固体支持物上。在一些实施方式中,抗原固定在固体支持物上。在一些实施方式中,固体支持物是反应室的表面。在一些实施方式中,固体支持物是聚合物膜(例如,硝基纤维素条、聚偏氟乙烯(PVDF)膜等)。可以使用其它合适的固体支持物。

[0380] 在一些实施方式中,抗体在与抗原接触之前固定在固体支持物上。在其它实施方式中,抗体的固定在结合复合物形成后进行。在再其它的实施方式中,抗原在结合复合物形成之前固定在固体支持物上。检测试剂添加到反应室以检测固定的结合复合物。在一些实施方式中,检测试剂包含针对抗原的可检测地标记的第二抗体。在一些实施方式中,第一抗体本身可检测地标记,且因而是检测试剂。

[0381] 在一个方面中,检测方法包括将抗体固定于固体支持物;在允许抗原与抗体(如果存在于样品中)的结合的条件下将样品(例如,生物样品或分离的蛋白质样品)应用于固体支持物;从固体支持物除去过量的样品;在允许可检测地标记的抗体与抗原结合的固定抗体的结合的条件下应用可检测地标记的抗体;洗涤固体支持物并测定固体支持物上标记物的存在的步骤。

[0382] 在一些实施方式中,抗原在反应室(例如,膜浴)中在与抗体接触之前固定于固体支持物如PVDF膜上。检测试剂添加到反应室以检测固定的结合复合物。在一些实施方式中,检测试剂包含针对抗原的可检测地标记的第二抗体。在一些实施方式中,检测试剂包含针对第一抗体的可检测地标记的第二抗体。如本文中公开的,可检测的标记可以是,例如,放射性同位素、荧光团、发光分子、酶、生物素部分、表位标签或染料分子。在一些实施方式中,第一抗体本身可检测地标记,且因而是检测试剂。合适的可检测标记在本文中描述,且对于本领域技术人员是容易明白的。

[0383] 因此,提供了适合家庭或临床使用(现场使用)的诊断试剂盒,其包含(a)作为抗原结合试剂(例如,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素结合试剂)的可检测地标记的和/或非标记的抗体;(b)检测试剂;及任选地,(c)使用该试剂检测样品中的抗原的完整说明。在一些实施方式中,诊断试剂盒包括抗体和/或固定在固体支持物上的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素。任何本文所述的固体支持物适合于并入诊断试剂盒中。在优选的实施方式中,固体支持物是平板孔的反应室的表面。通常,平板孔是在具有选自6、12、24、96、384和1536的多个孔的多孔板中,但不限于此。在其它实施方式中,诊断试剂盒提供可检测地标记的抗体。诊断试剂盒不限于这些实施方式,且试剂盒组成的其它变化对于本领域技术人员是容易明白的。

[0384] 因此,以下具体实施方式理解为仅是说明性的,且本公开的其余部分不是以任何方式限制性的。本文引用的所有公开出版物为本文中所称的目的或主题通过引用并入。

[0385] 实施例

[0386] 实施例1:抗体的产生和选择

[0387] 抗体总结

[0388] Ab2是IgG4/ λ 同种型的全人抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素单克隆抗体,其以高亲和力($K_d=3420\text{pM}$, ForteBio BLI)结合人原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素。抗体能够以0.5微摩尔范围(这处于或接近分析的极限)的 IC_{50} 值抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的蛋白水解激活。多肽的理论分子量是144,736Da且其理论pI是6.7。使

用抗体展示进行亲和力优化以鉴定较高亲和力变体Ab4和Ab6。亲和力优化的变体类似地在人IgG4/ λ 同种型框架上构建。

[0389] 表2: 候选抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的生物化学性质

[0390]	抗体	亲和力(Octet) pM	理论 MW (Da) *非糖基化的	计算的 pI
	Ab1	4760	144809.8	6.9
	Ab2	3420	144735.6	6.7
	Ab4	472	144661.7	6.7
	Ab6	331	144629.5	6.7

[0391] 亲本抗体的平台和鉴定

[0392] 亲本Ab1抗体使用原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素作为用于选择的主要抗原通过原始噬菌体展示文库的选择来鉴定。噬菌体选择和初始筛选使用与通过McCafferty等(McCafferty等, 1990)所述的类似的形式展示常规scFv的文库进行。各轮选择由预清除(用于除去非特异性噬菌体抗体)、与抗原孵育、洗涤、洗脱和扩增组成。选择使用固体相(免疫管上包被的生物素化抗原)和溶液相(使用链酶亲和素包被的珠捕获的生物素化抗原)淘选策略两者通过多轮进行。

[0393] 总计10,000个单独scFv克隆通过两个单独的行动筛选与原-肌生长抑制素或潜伏-肌生长抑制素的结合。第一程序利用原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素作为抗原,而第二行动使用潜伏肌生长抑制素作为抗原。用于目标scFv克隆的DNA被测序并鉴定216个独特的克隆。阳性结合scFv克隆针对与proGDF11以及与一组非相关的蛋白质的结合反向筛选以确认对于原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的特异性。从该组独特的scFv克隆,(134个GDF8特异性克隆)中的101个转化为全长IgG(IgG1同种型)用于另外的表征。

[0394] 全长IgG抗体进一步通过ELISA鉴定与人和鼠肌生长抑制素和GDF11的原-和潜伏-形式的结合。抗体也筛选与肌生长抑制素前结构域、proTGF β (人和鼠)、肌生长抑制素的成熟生长因子、GDF11成熟生长因子、激活素A生长因子和原激活素A的结合。前导抗体基于其与人和鼠原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的交叉反应性而没有与GDF11、激活素或TGF β 蛋白的相互作用来选择。

[0395] 使用两种形式的表位淘选。第一,设计和产生嵌合构建体,其交换肌生长抑制素和GDF11的前结构域的部分。这些嵌合蛋白通过ELISA测定与筛选抗体的相互作用。表位装箱(epitope binning)使用ForteBio BLI仪器完成,其中生物素化的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体固定在链酶亲和素包被的生物传感器芯片上,且通过传感器反应评估抗体的交叉阻断。这些表位装箱实验与来自ELISA结合实验的数据一起允许我们的功能活性前导抗体(参见以下)分离成三个不同表位组(参见表3)。

[0396] 表3: 五种抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素IgG1抗体的分级

	克 隆 ID	proGDF8 Kd (μ M) (octet)	人 proGDF8 IC50 ² (μ M) 报告分析	鼠 proGDF8 IC50 ² (μ M) 报告分析	6 周的%体 重增加 25 mg/kg/ 周	4 周的%瘦 体重增加 20 mg/kg/ 周	表 位 箱
[0397]	Ab1	11.5	0.996	1.46	14.58*	14.1*	1
	Ab7	28	0.983	1.68	12.42*	ND	1
	Ab8	0.5	6.037	139 ¹	10.33*	7.4	2
	Ab9	22	12.16	19.86	7.44	ND	3
	Ab10	0.3	0.772	ND	ND	14.3*	1

[0398] *通过单因素ANOVA与Dunnett的统计学显著性。

[0399] Ab8不结合潜伏肌生长抑制素,仅结合原肌生长抑制素。鼠原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素制备物具有~40%的潜伏物质,其在功能分析中降低明显功效。

[0400] ND:未测定。

[0401] 为了评估抗体结合和抑制原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的激活的能力,建立了多种生物化学和细胞分析。与原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素的结合动力学通过ForteBio Octet测量,其中生物素化的底物蛋白固定在链酶亲和素包被的传感器芯片上。来自筛选的候选者的平衡解离常数显示在表3中。

[0402] 为测量IgG抑制肌生长抑制素信号传导的能力,开发了肌生长抑制素激活分析。产生了来自过表达mT112(肌生长抑制素激活需要的tolloid蛋白酶)或弗林蛋白酶(从前结构域切割成熟生长因子的前体蛋白转化酶)的细胞的条件培养基。在与测试抗体预孵育后,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素或潜伏肌生长抑制素与mT112和弗林蛋白酶条件化培养基的混合物(原肌生长抑制素)或mT112条件化培养基(潜伏肌生长抑制素)一起孵育。在过夜蛋白水解反应后,成熟生长因子的释放使用293T细胞中的CAGA-基报告分析测量。抗体进一步在相同的分析中通过剂量反应验证,其结果显示于表3中。

[0403] 五种亲本抗体(表3)在所有以上分析中一致地表现出强选择性和活性,且还进行选择用于进一步的体内表征(实施例2中讨论的)。为了一致性,这些抗体对于原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的结合和活性被总结,如Ab8不识别潜伏肌生长抑制素。

[0404] 为确定抗体候选者的作用机制,样品使用针对肌生长抑制素的前结构域产生的多克隆抗体通过蛋白质印迹进行分析,如图3中所示。这允许追踪肌生长抑制素前结构域的片段(加框的),该片段在mT112切割后产生。随着Ab1浓度的提高,在这一片段的产生中看到剂量依赖性的降低。这一实验表明在表位箱1中的抗体通过阻断蛋白酶tolloid家族对原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素的切割发挥作用。

[0405] 基于活性抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的体外和体内活性,Ab1选择为用于进一步表征(包括亲和力成熟、种系化(germlining)和可制造性分析)的先导。

[0406] Ab1的优化

[0407] Ab1抗体选择用于进一步表征。对于原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的亲和力使用酵母展示优化。另外,Ab1的序列被种系化以降低人可变区框架内的非种系氨基酸位置

的潜在免疫原性倾向。

[0408] Ab1通过酵母展示的亲和力优化

[0409] Ab1亲本抗体使用基于酵母的scFv展示途径对于与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的结合进行优化。简言之，产生三个不同的scFv文库以基于使用抗体深度测序在天然人抗体库中观察到的氨基酸频率对应于Ab1利用的人框架引入点突变到所选择的CDR位置。各文库包含具有引入各CDR中的单一点突变的基于Ab1序列的scFv，使得所得重链或轻链的各变体具有总共三个置换，每个CDR中一个。三个文库用于基于FACS的分选和选择以鉴定具有对于原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的较高亲和力的克隆池（图23）。酵母表达的scFv克隆的直接结合用于选择用于转化成哺乳动物细胞培养物中表达的全长IgG的抗体。

[0410] 在酵母行动中鉴定的许多较高亲和力的scFv克隆包含重链的位置28处的置换。对于一些克隆，苏氨酸至天冬酰胺的置换导致CDRH1内非规则N-糖基化基序的加入。由于抗体可变区内的N-糖基化可能是不希望的，含糖基化基序的任何克隆进一步置换以在这一位置包含丙氨酸。

[0411] 与原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素的结合动力学然后通过octet对于各亲和力优化的构建体进行评价并与亲本Ab1进行比较（实施例2中讨论的）。所有克隆显示显著提高的对于肌生长抑制素的结合亲和力，且两个克隆（Ab3和Ab5）基于相对于GDF11的选择性结合特征来选择。

[0412] 抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体的初级序列和骨架

[0413] 亲本Ab1的可变区与其亲和力优化的变体的序列比对显示如下。互补决定区（CDR）使用Kabat（加下划线）和IMGT命名法（黑体）定义。从亲本Ab1的置换以小写文本显示（以下和图24A-24B）。

[0414] A. 重链可变区

	框架 1	CDR1	框架 2
Ab1 亲本	QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF	<u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u>	
Ab3	QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFaF	<u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u>	
Ab5	QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFaF	<u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u>	

[0415]

	CDR2	框架 3
Ab1 亲本	<u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN</u>	<u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>
Ab3	<u>VISYDGSiKYYADSVKGRFTISRDN</u>	<u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>
Ab5	<u>VISYDGnNKYYADSVKGRFTISRDN</u>	<u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>

	CDR3	框架 4
Ab1 亲本	<u>DLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGT</u>	<u>TVTVSS (SEQ ID NO: 24)</u>
Ab3	<u>DLLVRFLEWSHkYGMDVWGQGT</u>	<u>TVTVSS (SEQ ID NO: 26)</u>
Ab5	<u>DLLVRFLEWSHkYGMDVWGQGT</u>	<u>TVTVSS (SEQ ID NO: 28)</u>

[0417] B. 轻链可变区

	框架 1	CDR1	FRW2
Ab1 亲本	QPVL	TQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY	
Ab3	QPVL	TQPPSASGTPGQRVTISCSGStSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY	
Ab5	QPVL	TQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGgNTVHWYQQLPGTAPKLLIY	
	CDR2	框架 3	
[0418] Ab1 亲本	SDNQ	RPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
Ab3	SDdQ	RPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
Ab5	SDdQ	RPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
	CDR3	框架 4	
Ab1 亲本	AAWDDSLNGVFGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 30)	
Ab3	AAWDeSLNGVFGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 32)	
Ab5	AAWDeSLNGVFGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 34)	

[0419] 抗体工程和同种型选择的基本原理

[0420] 在一些实施方式中,可用于肌生长抑制素阻断的抗体将缺乏效应子功能。因此对于人源化构建体,选择IgG4-Fc区。IgG4同种型的抗体较差地结合补体C1q且因此不显著地激活补体。这些抗体也与Fc γ 受体弱结合,从而导致不足的或缺乏抗体-依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0421] 为避免由于Fab-臂交换(其已知发生于原始IgG4 mAb)导致的潜在并发症,Ab1及其变体用稳定的“Adair”突变工程化(Angal, 1993),其中丝氨酸228(EU编号;残基241Kabat编号)转化为脯氨酸,导致IgG1-样(CPPCP(SEQ ID NO: 58))铰链序列。这一工程化的Fc-序列用于生产批准的抗体Keytruda、Mylotarg和Tysabri以及多种当前的后期临床候选mAb。

[0422] 种系化和免疫原性风险评价

[0423] Ab1亲本抗体及其变体是源自噬菌体展示的全人IgG4(S228P) λ 抗体。抗体的Fc部分包含单一稳定突变以防止Fab臂交换(如上所述)。该IgG4 Fc不预期具有可测量的与Fc γ 受体的结合(参见实施例2)。

[0424] 如从全人原始噬菌体展示分离的Ab1的可变框架区包含五个非种系氨基酸(参见以下和图22)。互补决定区(CDR)使用Kabat命名法定义和加下划线。非种系残基以小写显示。

[0425] A. 重链可变区

```

<-----FR1-----><CDR><-----FR2-----><-----CDR2----->
Ab1      QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
IgHV3-30.v...e.....

```

[0426]

```

<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->
Ab1      RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYGYMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO: 24)
IgHV3-30      ..... (SEQ ID NO: 36)
JH6      ..... (SEQ ID
NO: 59)

```

[0427] B. 轻链可变区

```

<-----FR1-----><-----CDR1-----><-----FR2-----><CDR2-->
Ab1      QPVLTPPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSS
IgLV1-44 .s.....n.....n.....

```

[0428]

```

<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->
Ab1      GVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:30)
IgLV1-44 .....a.....e..... (SEQ ID NO: 60)
JL1/2/3 ..... (SEQ ID NO: 61)

```

[0429] 为减轻对于免疫原性的潜能,产生另外的Ab1分子的变体,其将非-种系框架残基替代为其相应的种系氨基酸。在一些实施方式中,涉及Ab1的置换可以类似地应用于Ab3和Ab4或者种系化对于其合适的本文公开的任何抗体。

[0430] Ab1可变区与其亲和力优化的变体的序列比对显示如下:A.) 重链、B.) 轻链。互补决定区(CDR)使用Kabat(加下划线)和IMGT命名法(黑体)定义。存在于亲本Ab1中的框架区置换以小写显示。

[0431] A • 重链可变区

	框架 1	CDR1	框架 2
IgHV3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
Ab1	QIQLVqSGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
Ab2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
Ab4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFAFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
Ab6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFAFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA

[0432]

	CDR2	框架 3
IgHV3-30	VISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab1	VISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab2	VISYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab4	VISYDGS I KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab6	VISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	

	CDR3	框架 4
IgHV3-30	-----	(SEQ ID NO: 36)
Ab1	DLLVRFLEWSHYGYMDV WGQGTTVTVSS	(SEQ ID NO: 24)
Ab2	DLLVRFLEWSHYGYMDV WGQGTTVTVSS	(SEQ ID NO: 25)
Ab4	DLLVRFLEWSHKYGM DVWGQGTTVTVSS	(SEQ ID NO: 27)
Ab6	DLLVRFLEWSHKYGM DVWGQGTTVTVSS	(SEQ ID NO: 29)

[0433] B • 轻链可变区

	框架 1	CDR1	FRW2
IgLV1-44	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSS	SSNIGSNT	VNHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab1	QpVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSS	SSNIGSNT	VHWHYQQLPGTAPKLLIY
Ab2	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSS	SSNIGSNT	VHWHYQQLPGTAPKLLIY
Ab4	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSG	STSNIGSNT	VHWHYQQLPGTAPKLLIY
Ab6	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSG	SSNIGGNT	VHWHYQQLPGTAPKLLIY
[0434]			
	CDR2	框架 3	
IgLV1-44	SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab1	SDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
Ab2	SDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab4	SDDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab6	SDDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
[0435]			
	CDR3	框架 4	
IgLV1-44	-----	(SEQ ID NO: 60)	
Ab1	AAWDDSLNGV	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)	
Ab2	AAWDDSLNGV	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)	
Ab4	AAWDES	SLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)	
Ab6	AAWDES	SLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 35)	

[0436] 五个置换中的三个被发现远离CDR区且因此对结合没有影响。轻链的位置2处的脯氨酸针对CDRL3包装,且置换为种系丝氨酸实际上通过稳定CDR构象改善与原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的结合。

[0437] 总体上抗体为高于99%的人的(计算为100%减去%非种系AA,排除CDRH3)。不存在化学缀合。重链CDRH2序列包含潜在的异构化倾向(Asp-Gly),其也存在于种系IgHV3-30序列中。

[0438] 实施例2:药理学表征

[0439] 体外药理学分析

[0440] 总共24个优化的Ab1变体作为IgG4表达和纯化,并测定改善的结合和功能活性。对这些分子的改变包括对亲本可变区的种系化突变以及CDR中的突变,其在亲和力成熟筛选中赋予提高的对原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素的结合(参见实施例1)。

[0441] Ab1变体在几种不同的基于ELISA的分析中筛选,其中与原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素蛋白(人、鼠和食蟹猴)的结合与阴性对照蛋白的大量筛选一起重新评估以验证非特异性结合不因为亲和力成熟而引入。阴性对照包括GDF11蛋白(proGDF11、潜伏GDF11和成熟GDF11)、TGFβ蛋白和激活素蛋白(原激活素)。另外,抗体在与之前公布的(Hotzel等, 2012)相似的筛选中评估多特异性(其可导致快速清除)。在多特异性筛选中具有与阴性对照蛋白或与杆状病毒颗粒的显著相互作用的任何抗体不进一步考虑作为用于开发程序的候选者。

[0442] 24个优化的Ab1变体也在原肌生长抑制素激活分析中评估以测定其功能效力,且来自剂量反应曲线的EC50值与亲本Ab1抗体比较。大多数抗体具有等同或改善的EC50值,少数在这一分析中显示出降低的效力。在活性分析中具有降低的效力的那些从进一步的分析排除。

[0443] 鉴定了具有改善的与原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的结合而同时保持对于原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的特异性的三个变体。这三个变体和亲本Ab1分子的结合和活性数据总结于表4-7中,序列显示于实施例1中。

[0444] 表4:针对人/食蟹猴/小鼠原肌生长抑制素的抗体与亲本Ab1IgG4的结合特征。

[0445]	Ab1				
	活性分析 - 293T 细胞		动力学分析 - Fortebio Octet		
		EC50 (μ M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Kd (M)
	人	0.274	4.18E+05	1.99E-03	4.76E-09
	食蟹猴	0.5842	3.05E+05	1.75E-03	5.75E-09
	小鼠	0.8386	2.37E+05	2.62E-03	1.10E-08

[0446] 表5:针对人/食蟹猴/小鼠原肌生长抑制素的抗体与具有替换为非种系化残基的正确种系残基Ab1 IgG4 (Ab2) 的结合特征。

[0447]	Ab2				
	活性分析 - 293T 细胞		动力学分析 - Fortebio Octet		
		EC50 (μ M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Kd (M)
	人	0.248	4.57E+05	1.56E-03	3.42E-09
	食蟹猴	0.6168	2.78E+05	1.41E-03	5.08E-09
	小鼠	0.7138	2.35E+05	1.97E-03	8.39E-09

[0448] 表6:针对人/食蟹猴/小鼠原肌生长抑制素的抗体与包含校正的种系残基的Ab3 IgG4 (Ab4) 的结合特征。

[0449]	Ab4				
	活性分析 - 293T 细胞		动力学分析 - Fortebio Octet		
		EC50 (μ M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Kd (M)
	人	0.179	4.98E+05	2.35E-04	4.72E-10
[0450]	食蟹猴	0.4451	3.01E+05	2.34E-04	7.76E-10
	小鼠	0.4466	2.53E+05	2.72E-04	1.08E-09

[0451] 表7:针对人/食蟹猴/小鼠原肌生长抑制素的抗体与包含校正的种系残基的Ab5 IgG4 (Ab6) 的结合特征。

[0452]	Ab6				
	活性分析 - 293T 细胞		动力学分析 - Fortebio Octet		
	EC50 (nM)		kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Kd (M)
	人	0.151	5.27E+05	2.51E-04	4.77E-10
	食蟹猴	0.4037	3.50E+05	2.57E-04	7.35E-10
	小鼠	0.3068	2.94E+05	2.81E-04	9.54E-10

[0453] 基于细胞的离体和体内生物活性分析

[0454] 在剂量反应研究中, Ab1优化变体在GDF8激活分析中评价。在这些实验中, 0.5 μ M原肌生长抑制素与增加量的测试品预孵育。在这一预孵育步骤后, 添加来自过表达mT112和弗林蛋白酶的HEK293细胞的条件化培养基以从原肌生长抑制素释放成熟生长因子。在30℃下孵育过夜后, 物质添加到携带SMAD-基荧光素酶报告质粒的293T细胞, 且记录释放的物质的活性。来自筛选的数据显示于图4中。

[0455] 相对于其它TGF β 家族成员对肌生长抑制素的选择性

[0456] 候选抗体的选择性也通过结合和功能分析两者评估以验证对于TGF β 家族的其它成员的交叉反应性的缺乏。人肌生长抑制素和GDF11在成熟生长因子结构域中共有90%同一性, 且在前结构域区域中共有47%同一性。从表位作图研究确定, 亲本Ab1分子识别原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的前结构域上的表位, 因为ELISA分析已经显示这一抗体与由肌生长抑制素的前结构域组成的构建体的结合。尽管肌生长抑制素和GDF11的前结构域共有小于50%的同一性, 且我们不预期显著的交叉反应性, 但先导抗体的特异性仔细地评估。

[0457] 开发了用于检测目标抗体和阴性对照试剂之间的相互作用的灵敏分析。在这一分析中, 生物素化proGDF11或生物素化原肌生长抑制素固定在ForteBio BLI链酶亲和素包被的传感器尖端上, 其应用于包含30 μ g/mL的抗体的孔。分析物与固定在芯片上的蛋白质的相互作用通过生物传感器芯片的反应强度测量。在5分钟的结合后的生物传感器反应(对于proGDF8的饱和信号)在两个抗原之间比较, 并表示为对于GDF8结合的百分反应。与对于原肌生长抑制素测量的稳定结合事件相比, 所有抗体具有与proGDF11的最小相互作用。

[0458] 表8: 在候选分子的高浓度下与proGDF11的相互作用

[0459]		表示为GDF8反应的百分比的GDF11反应
	Ab1	1.33%
	Ab2	0.81%
	Ab4	2.51%
	Ab6	2.07%

[0460] 抗体候选者也在GDF11激活分析中评估。在这一分析中, 50nM proGDF11与提高浓度的抗体预孵育。在预孵育后, 添加来自过表达BMP-1 (tolloid家族蛋白酶) 和PCSK5 (对于GDF11特异性的弗林蛋白酶家族成员) 的HEK293细胞的条件化培养基以蛋白水解激活proGDF11。在30℃下过夜孵育后, 反应混合物在基于SMAD的报告细胞系中针对GDF11活性进

行评价。如表8中所示,抗-肌生长抑制素抗体不抑制proGDF11激活,而阳性对照抗体施加剂量依赖性的GDF11激活的抑制。

[0461] 抗体候选者的结合亲和力使用利用了生物层干涉法的FortéBio Octet QKe浸试即读无标记分析系统测定。抗原在各实验中固定于生物传感器(对于proGDF8、proGDF11和原激活素的链酶亲和素包被的生物传感器;对于所有其它抗原的直接胺偶联)且抗体/构建体以高浓度(50μg/mL)存在于溶液中以测量结合相互作用。

[0462] 抗体的结合亲和力使用利用了生物层干涉法的FortéBio Octet QKe浸试即读无标记分析系统测定。人proGDF8、潜伏GDF8、proGDF11和原激活素被生物素化并固定于链酶亲和素-包被的生物传感器(FortéBio)。成熟生长因子按照制造商的说明(FortéBio)通过直接胺偶联固定于胺反应性尖端。在各实验中,抗体/构建体以单一高浓度(50μg/mL)存在于溶液中以测量结合相互作用。生长因子购自R&D systems,和生物素化的蛋白质如所述的产生。

[0463] 表9a:抗体对于与不同形式的几种TGFβ家族成员的结合的比较。

	<i>Ab2</i>	<i>Ab4</i>	<i>Ab6</i>	<i>Ab1</i>
Pro GDF8	7.35E-09	9.24E-10	8.89E-10	6.23E-09
潜伏 GDF8	7.84E-09	1.10E-09	1.12E-09	9.06E-09
成熟 GDF8	-	-	-	-
Pro GDF11	-	*1.25E-07	*6.07E-08	-
成熟 GDF11	-	-	-	-
原激活素 A	-	-	-	-
成熟激活素 A	-	-	-	-
BMP 9	-	-	-	-
BMP10	-	-	-	-
成熟 TGFB1	-	-	-	-

[0465] *非特异性结合。

[0466] 来自抗原结合研究的结果总结于表9a中。没有可检测的结合的实验通过负号(-)注明。存在一些计算的Kd值,其与具有不良结合反应的数据符合,这在表中作为弱的非特异性结合表示(*)。

[0467] 由于表9a中使用的proGDF8样品包含大约10-15%的潜伏GDF8,单独的实验用于确认proGDF8特异性地与人和鼠GDF8抗原结合。另外,激发的GDF8(其中proGDF8通过前体蛋白转化酶和tolloid蛋白酶两者蛋白水解切割)也评价与Ab2和AbMyo的结合亲和力。对于这些实验,人proGDF8的同源制备物从在30μM癸酰基-RVKR-CMV存在下培养的整合的293细胞纯化。激发的人GDF8通过利用来自mT112-过表达细胞的条件下培养基和纯化的弗林蛋白酶的proGDF8的体外切割产生。在这些蛋白质的结合实验中,150nM的Ab2或AbMyo用于饱和人Fc捕获尖端(FortéBio)上的固定位点,且评估150nM分析物的结合和解离。

[0468] 也评价与鼠蛋白质的结合亲和力的分析并报告在表9b中。鼠proGDF8蛋白通过用

紧密地识别潜伏和成熟GDF8的抗体 (AbMyo2) 经负向选择从样品除去所有成熟和潜伏鼠GDF8产生。50nM的抗体用于饱和抗-人Fc捕获尖端 (FortéBio)。最初,所有抗体针对单一200nM浓度的鼠proGDF8、鼠潜伏GDF8和成熟GDF8进行测试。如果观察到结合,Kd值通过如之前所述固定抗体和使用通过3-倍稀释的200-0.82nM滴定的分析物测定。Kd利用FortéBio数据分析软件8.2使用整体拟合确定。对于与成熟肌生长抑制素的结合,5ug/mL的生长因子 (R&D systems) 在pH 5的乙酸盐缓冲液中与胺反应性传感器尖端 (FortéBio) 偶联。所有抗体初始以333nM测试与这一肌生长抑制素-偶联传感器的结合。显示出结合的抗体然后在通过3倍稀释的333-1.37nM范围的浓度中测试。整体拟合用于使用FortéBio数据分析8.2确定相互作用的Kd。

[0469] 表9b:抗体对于与不同形式的人和鼠GDF8的进行的比较。

		<i>Ab2</i>	<i>AbMyo</i>
[0470]	人 Pro GDF8	2.9 E-09	-
	人潜伏 GDF8	2.4 E-9	3.87E-10
	人激发的 GDF8	8.66E-09	8.83E-10
[0471]	成熟 GDF8	-	4.7 E -11
	鼠 ProGDF8	2.3 E-09	-
	鼠潜伏 GDF8	2.0 E-09	< 1 E-12

[0472] 来自抗原结合研究的结果总结在表9b中。没有可检测的结合的实验通过负号 (-) 注明。一些值,标记为<1E-12,具有非常低的解离速率,使得高亲和力不能被定量。令人惊异地,AbMyo不能识别重组proGDF8,其与Latres等2015中报告的结果不同,在该文献中作者报道了在来自用抗体给药的小鼠的血清的免疫沉淀实验中AbMyo与proGDF8的结合,其可产生假象。另一令人惊异的结果是Ab2和激发的GDF8 (GDF8与tolloid-切割的前结构域的复合物) 之间的相互作用。这一结果是出人意料的,因为Ab2阻断前结构域的tolloid切割并表明Ab2与proGDF8和潜伏GDF8的相互作用不需要完整的tolloid切割位点。

[0473] Fc-区功能性的评价

[0474] 在一些实施方式中,抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素疗法涉及与可溶性靶标 (原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素) 的结合和防止蛋白水解激活。在一些实施方式中,抗体依赖的细胞介导细胞毒性和补体固定不参与这一过程。Ab1及其相关变体经工程化以包含IgG4-Fc区。应理解IgG4抗体一般由于其与补体组分C1q和Fc γ 受体的弱结合而缺乏效应子功能。

[0475] 为证明降低的效应子功能的能力,Ab1和相关抗体通过ELISA测试与CD64 (Fc γ RI) 和C1q的结合。为进行比较,也制备Ab1的IgG1变体。在这一分析中,所有IgG4抗体与IgG1相比显示出与CD64和C1q的显著较弱的结合 (10至20-倍)。EC50下的相对结合值列于表10中。

[0476] 表10:Ab2和相关抗体对CD64的相对结合亲和力。

[0477]	抗体	同种型	相对 CD64 结合 @ EC50(%)	相对 C1q 结合 @ EC50(%)
	Ab1-G1	IgG1	100	100
	Ab1	IgG4 (S228P)	10	ND
	Ab2	IgG4 (S228P)	5	8
	Ab3	IgG4 (S228P)	5	5
	Ab5	IgG4 (S228P)	8	9

[0478] 未测定

[0479] Ab1及其相关变体与CD64和C1q的表观结合亲和力与其它IgG4临床候选抗体相似，且与IgG1同种型的抗体相比显著降低。基于IgG4抗体的生物学，因此得出抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体在体内不诱导明显的效应子功能的结论。

[0480] 动物模型中的效力

[0481] 基于体外表征，选择四种抗体在体内研究中测试 (Ab7、Ab1、Ab8和Ab9)。该研究的目的是评价这四种候选抗体调节小鼠肌肉质量的能力。十只 (10) 雌性SCID小鼠的五个 (5) 组在第0、7、14、21、28和35天每周一次通过腹膜内 (IP) 注射接受测试品施用。在测试品施用 (第0天) 之前，所有动物进行握力评估。握力评估也在研究的最后一天 (第42天) 进行。在第0天，通过眼球后取血收集血液用于全血计数 (CBC) 的评价。在给药后，动物每日评估体重和总体健康观察。在第42天，在握力评价后，动物通过CO₂过量处死且血液通过心脏穿刺收集用于CBC评价。收集另外的血液用于制备血浆。分离各种组织并称重。收集的肌肉是：腓肠肌、胸肌、比目鱼肌、三头肌、胫骨前肌、四头肌 (股直肌) 和膈肌。收集的器官是：心脏、肾脏、脾脏、肝脏和腹股沟白色脂肪组织。除腓肠肌 (其在福尔马林 (腿1) 和OCT (腿2) 中固定用于组织学分析) 外，所有组织称重并急冻。

[0482] 总结

[0483] 在研究SCH-02中对于动物的平均每日百分重量变化数据显示于图6中。所有五个组中的动物每周体重增加。用抗体Ab1治疗的动物如图6中显示的具有最大的体重增加 (14.6%)。与溶剂 (PBS) 对照组中的动物相比，仅Ab1处理的动物具有平均每日百分体重变化的统计学显著的增加 (图6)。

[0484] 所切除的肌肉的重量在图7和8中作图。与溶剂 (PBS) 对照处理的动物相比，用Ab1处理的动物具有腓肠肌 (图7A) 和膈肌 (图8B) 重量的统计学显著的增加，分别27.6%和49.8%。与PBS对照相比，来自Ab1处理动物的另外的肌肉显示重量的增加，但这些差异不是统计学显著的。对于心脏、脾脏、肾脏、肝脏和脂肪组织的平均组织重量，处理组之间不存在统计学显著的差异。

[0485] SCID剂量反应研究

[0486] 在体内研究 (以上) 中，以每周一次25mg/kg给药Ab1，持续6周的动物与给予溶剂 (PBS) 的动物相比显示出统计学显著的体重和肌肉重量 (腓肠肌和膈肌) 的增加。Ab1的这种肌肉增强活性接下来在SCID小鼠的剂量反应研究中更详细地进行研究。在这一研究中，检验了是否对肌肉质量的作用的强度可以通过增加Ab1的剂量到高达60mg/kg/wk而提高和是

否对肌肉质量的作用的强度可以通过降低Ab1的剂量到低至2mg/kg/wk而降低。在这一研究中,Ab1的活性与另两种抗体(Ab8,其原来在上述研究上测试,Ab10)比较。

[0487] 十只(10)雌性SCID小鼠的十(10)个组在第0、3、7、10、14、17、21和24天每周两次通过腹膜内(IP)注射(10ml/kg)接受测试品施用。测试品的剂量如下:Ab1(30mg/kg、10mg/kg、3mg/kg和1mg/kg)、Ab10(10mg/kg和3mg/kg)和Ab8(10mg/kg和3mg/kg)。对照组用PBS和IgG-对照(30mg/kg)给药。处理组描述于表11中。动物在研究开始时是10周龄的。体重在第-4天和在整个研究中每周两次(对应于给药日)测量。身体质量组成参数(脂肪量、瘦体重和水含量)通过Echo MRI (QNM)在第-4、7、14、21和28天测量。在第一抗体剂量后三十(30)天,动物通过CO₂过量处死且血液通过心脏穿刺收集用于CBC评价和血浆制备。另外,在研究结束时,分离各种组织并称重。收集的肌肉是:腓肠肌、比目鱼肌、胫骨前肌、四头肌(股直肌)和膈肌。肌肉从研究小鼠的右腿和左腿两者切除。为进行分析,将来自两只腿的单个肌肉的重量组合并计算按克计的平均肌肉重量。收集的其它组织是:心脏、肾脏、脾脏、肝脏和脂肪组织。除腓肠肌(其在福尔马林(左腿)和OCT(右腿)中固定用于组织学分析)外,所有组织称重并然后急冻。

[0488] 表11:研究设计

处理组	测试品剂量	剂量#/周	总剂量/周	动物ID
1	PBS对照	2	0	1-10
2	IgG对照(30mg/kg)	2	60mg/kg/wk	11-20
3	Ab1(30mg/kg)	2	60mg/kg/wk	21-30
4	Ab1(10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	31-40
5	Ab1(3mg/kg)	2	6mg/kg/wk	41-50
6	Ab1(1mg/kg)	2	2mg/kg/wk	51-60
7	Ab10(10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	61-70
8	Ab10(3mg/kg)	2	6mg/kg/wk	71-80
9	Ab8(10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	81-90
10	Ab8(3mg/kg)	2	6mg/kg/wk	91-100

[0490] 来自用溶剂(PBS)、IgG对照和不同剂量的Ab1处理的动物的平均百分重量变化和平均百分瘦体重变化数据显示于图9中。用20和60mg/kg/wk剂量的Ab1处理的动物与IgG对照处理的动物相比在研究的第28天具有显著的体重增加,分别15.3%和14.4%(图9A)。用Ab1(60、20、6和2mg/kg/wk剂量)处理的所有四组动物与IgG对照处理的动物相比在研究的第28天具有统计学显著的瘦体重增加,分别14.1%、12.4%、17.1%和15.5%(图9B)。

[0491] 四种肌肉(四头肌、腓肠肌、胫骨前肌和膈肌)的重量在图10中作图。比目鱼肌也切除,但肌肉的小尺寸导致高度可变的数据集。用所有剂量的Ab1处理的动物与IgG对照动物相比具有统计学显著的肌肉重量增加(图10)。与IgG对照相比肌肉质量的平均百分变化在各肌肉曲线上相应的条上方显示。四头肌的平均百分重量变化范围为从最高剂量的20.5%至最低剂量的10.7%(图10A)。腓肠肌的平均百分重量变化范围为从最高剂量的17.7%至最低剂量的15.9%(图10B)。胫骨前肌的平均百分重量变化范围为从最高剂量的24.0%至最低剂量的18.0%(图10C)。膈肌的平均百分重量变化对于所有剂量组大于30%(图10D)。对于心脏、脾脏、肾脏、肝脏和脂肪组织的平均组织重量在处理组之间不存在统计学显著的

差异。

[0492] 地塞米松诱导的肌肉萎缩模型中的Ab1处理

[0493] 既然已知抗-肌生长抑制素抗体Ab1在健康SCID小鼠中增加肌肉质量的能力,确定是否Ab1处理也可以针对诱导肌肉萎缩的处理保护动物。皮质类固醇诱导的肌肉萎缩的模型通过用其饮水中的地塞米松处理动物两周建立。选择的剂量(2.5mg/kg/天)能够诱导瘦体重和单个后肢肌肉的质量的显著降低。在以下实验中,动物用不同剂量的Ab1处理以确定它是否可以保护动物免于这种地塞米松-诱导的肌肉萎缩的影响。

[0494] 在这一研究中,十只(10)雄性小鼠(C57BL/6)的八个(8)组以13.5周龄入组研究中。在研究的第0天开始,小鼠给予正常饮水(组1-4)或包含地塞米松的水(组5-8)。测试品在第0、3、7和10天每周两次通过腹膜内(IP)注射(10ml/kg)施用。测试品和剂量如下:PBS(组1和5)、10mg/kg IgG Ct1(组2和6)、10mg/kg Ab1(组3和7)和1mg/kg Ab1(组4和8)。处理组描述于表12中。体重在整个研究中至少每周测量两次。身体质量组成参数(脂肪量、瘦体重和水含量)通过Echo MRI (QNM)在第-1、6和13天测量。在第一抗体剂量后十四(14)天,动物通过CO₂过量处死且血液通过心脏穿刺收集用于血浆制备。另外,在研究结束时,分离各种组织并称重。收集的肌肉是:腓肠肌、比目鱼肌、胫骨前肌、四头肌(股直肌)和膈肌。肌肉从研究小鼠的右腿和左腿两者切除。为进行分析,将来自两只腿的单个肌肉的重量组合并计算按克计的平均肌肉重量。收集的其它组织是:心脏、肾脏、脾脏、肝脏和脂肪组织。除腓肠肌(其在福尔马林(左腿)和OCT(右腿)中固定用于组织学分析)外,所有组织称重并然后急冻。

[0495] 表12:用于地塞米松诱导萎缩症模型研究的处理组

处理组	饮水中的地塞米松	测试品剂量	剂量#/周	总剂量/周	动物ID
1	无	PBS 对照	2	0	1-10
2	无	IgG 对照 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	11-20
3	无	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	21-30
4	无	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	31-40
5	2.5 mg/kg/天	PBS 对照	2	0	51-60
6	2.5 mg/kg/天	IgG 对照 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	61-70
7	2.5 mg/kg/天	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	71-80
8	2.5 mg/kg/天	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	81-90

[0497] 在这一实验中,确定小鼠用抗-肌生长抑制素抗体Ab1的处理是否可以保护动物免于皮质类固醇诱导的肌肉萎缩。在研究期间,体重每周测量两次且瘦体重在第-1、6和13天通过QNM测量。非疾病对照组(组1)和地塞米松处理组(组5-8)中的动物的平均百分重量变化和平均百分瘦体重变化数据显示于图11中。在第14天这些处理组中任何组之间在平均百

分体重变化上不存在显著差异(图11A)。小鼠用地塞米松处理两周与给予正常饮水的对照组(组1)相比导致瘦体重的显著降低(组5和6)(图11B)。但是,用地塞米松和20mg/kg/wk的抗体Ab1两者处理的小鼠(组7)与对照组(组1)相比在研究的第14天没有显示瘦体重百分变化的显著差异。用20mg/kg/wk而非2mg/kg/wk的Ab1处理的动物当与地塞米松处理对照组(组5和6)任一比较时在第14天显示瘦体重百分变化的显著差异。

[0498] 在地塞米松和测试品的两周处理结束时,切除单个肌肉并称重。两种肌肉(腓肠肌和四头肌)的重量数据在图12A-12B中作图。通过其饮水接受地塞米松且也接受PBS或IgG对照抗体的动物与非疾病对照组(组1)相比显示腓肠肌和四头肌的显著萎缩(组5和6)。用地塞米松和20mg/kg/wk(而非2mg/kg/wk)的Ab1两者处理的动物(组7)在与地塞米松处理的对照组(组5和6)任一比较时显示肌肉重量的显著差异。另外,用地塞米松和20mg/kg/wk的抗体Ab1两者处理的小鼠(组7)在与非疾病对照组(组1)相比时没有显示腓肠肌和四头肌重量的显著差异。各组与对照组(组1,PBS和水)的平均肌肉重量相比的肌肉重量的平均百分差异显示于图12C-12D中。地塞米松处理在PBS和IgG Ctl组中诱导的腓肠肌质量的百分降低分别是16.5%和18.9%。相反,用地塞米松和20mg/kg/wk的Ab1两者处理的动物仅具有腓肠肌肌肉质量的4.0%降低,其与非疾病对照组(组1)没有显著差异。尽管用地塞米松和2mg/kg/wk的Ab1两者处理的动物(组8)仅具有腓肠肌肌肉质量的10%降低,该组的肌肉质量降低与PBS和IgG对照组(组5和6)的降低相比没有显著差异。类似的结果对于四头肌观察到(图12D)。

[0499] 石膏诱导肌肉萎缩模型中的Ab1处理

[0500] 已知抗-肌生长抑制素抗体Ab1在健康SCID小鼠中增加肌肉质量的能力,研究了是否Ab1处理也可以针对诱导肌肉萎缩的处理保护动物。失用性萎缩的模型通过小鼠右腿打石膏两周建立。使足部处于跖屈位置对右腿打石膏持续这一时间段能够诱导单个后肢肌肉质量的显著降低。在以下实验中,动物用不同剂量的Ab1处理以确定其保护动物免于这种石膏诱导的肌肉萎缩的程度。

[0501] 表13:用于石膏诱导萎缩模型研究的处理组

[0502]	处 理 组	石 膏	测试品剂量	剂 量 #/ 周	总剂量/周	动 物 ID
	1	无石膏	PBS 对照	2	0	1-10
	2	无石膏	IgG 对照(10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	11-20
	3	无石膏	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	21-30
	4	无石膏	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	31-40
	5	打石膏	PBS 对照	2	0	51-60
	6	打石膏	IgG 对照(10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	61-70
	7	打石膏	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	71-80
	8	打石膏	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	81-90

[0503] 在这一研究中,十只(10)雄性小鼠(C57BL/6)的八个(8)组以14.5周龄入组研究

中。在研究的第0天开始,小鼠置于麻醉下且石膏以使足部处于跖屈位置应用于右后肢(组5-8)。对照组(组1-4)也置于麻醉下但石膏不放置于后肢上。测试品在第0、3、7和10天每周两次通过腹膜内(IP)注射(10ml/kg)施用。测试品和剂量如下:PBS(组1和5)、10mg/kg IgG Ctl(组2和6)、10mg/kg Ab1(组3和7)和1mg/kg Ab1(组4和8)。处理组描述于表13中。体重在整个研究中至少每周测量两次。身体质量组成参数(脂肪量、瘦体重和水含量)通过Echo MRI (QNM)在第-1、7和14天测量。在第一抗体剂量后十四(14)天,动物通过CO₂过量处死且血液通过心脏穿刺收集用于血浆制备。

[0504] 另外,分离各种组织并称重。收集的肌肉是:腓肠肌、比目鱼肌、跖肌、胫骨前肌和四头肌(股直肌)。为进行分析,收集来自动物右后肢的单个肌肉的重量。收集的其它组织是:心脏、脂肪组织和脾脏。除腓肠肌(其在福尔马林中固定用于组织学分析)外,所有组织称重并然后急冻。

[0505] 总结

[0506] 在这一实验中,测试了小鼠用抗-肌生长抑制素抗体Ab1处理是否可以保护小鼠免于由右后肢打石膏诱导的失用性肌肉萎缩。在研究期间,体重每周测量两次且瘦体重在第-1、7和14天通过QNM测量。非疾病对照组(组1)和打石膏两周的组(组5-8)的动物的平均百分重量变化和平均百分瘦体重变化数据显示于图13中。右后肢打石膏对体重增加没有任何负面作用(图13A)且组的任何瘦体重差异不是显著的(图13B)。

[0507] 在两周研究结束时,切除单个肌肉并称重。两种肌肉(腓肠肌和四头肌)的重量数据在图14A-14B中作图。腿部打石膏且也接受PBS或IgG对照抗体的动物与不打石膏的对照组(组1)相比显示腓肠肌和四头肌的显著萎缩(组5和6)。打石膏且也以20mg/kg/wk而非2mg/kg/wk给药Ab1的动物(组7)当与打石膏对照组(组5和6)任一相比时显示肌肉重量的显著差异。另外,用20mg/kg/wk的抗体Ab1处理的打石膏的小鼠(组7)在与不打石膏的对照组(组1)相比时未显示腓肠肌和四头肌重量的显著差异。各组的肌肉重量与不打石膏的对照组(组1)的平均肌肉重量相比的平均百分差异显示于图14C-14D中。在PBS和IgG Ctl组中通过打石膏诱导的腓肠肌质量的百分降低分别是22.8%和23.5%。相反,用20mg/kg/wk的Ab1处理的打石膏小鼠仅具有10.0%的腓肠肌肌肉质量降低。这一差异发现与接受PBS和IgG Ctl抗体的打石膏对照组(组5和6)在统计学上是不同的。用2mg/kg/wk Ab1处理的打石膏小鼠的肌肉质量降低与PBS和IgG对照组(组5和6)的降低相比没有统计学差异。类似的结果对于四头肌观察到(图14D)。

[0508] 原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的结构域结构(指示蛋白酶切割位点)显示于图16A中。在SDS PAGE凝胶上运行的部分前体蛋白转化酶切割的原肌生长抑制素的实例显示于图16B中。在还原条件下,蛋白条带由原肌生长抑制素单体(~50kD)、前结构域(~37kD)和生长因子(12.5kD)组成。

[0509] Ab1特异性地结合原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素,而没有观察到与TGFβ超家族的其它成员的结合,最显著地GDF11的对应形式(图17A)。Ab1以高浓度(50ug/mL)施用于用所示抗原包被的Forte-Bio BLI尖端并测量结合和解离速率以获得近似K_d值。生物传感器反应(指示结合事件)的强度通过黑色条图形表示,且计算的K_d以橙色指示。而且Ab1阻断原肌生长抑制素的激活,但不阻断proGDF11的激活(图17B)。

[0510] Ab1、Ab2、Ab4和Ab6的SCID剂量反应研究

[0511] 之前的Ab1体内研究已经证明Ab1可以增加健康动物的肌肉质量以及在小鼠肌肉萎缩模型(地塞米松和石膏诱导的萎缩)中防止肌肉损失。抗体工程的工作鉴定了具有优于Ab1的体外特征三个抗体。在这一研究中,在SCID小鼠中,这些抗体的体内活性在三个不同剂量下与早已确定的Ab1活性比较。

[0512] 八只(8)雌性SCID小鼠的十四组(14)组在第0、3、7、10、14、17、21和24天每周两次通过腹膜内(IP)注射(10ml/kg)接受测试品施用。测试品的剂量如下:Ab1、Ab2、Ab4和Ab6以3个不同剂量(10mg/kg、1mg/kg和0.25mg/kg)给予且IgG-Ct1抗体以10mg/kg给予。处理组描述于表14中。动物在研究开始时为10周龄。体重在整个研究中每周测量两次(对应于给药日)。身体质量组成参数(脂肪量、瘦体重和水含量)在第0、7、14、21和28天通过Echo MRI (QNMR)测量。在第一抗体剂量后二十八(28)天,动物通过CO₂过量处死且血液通过心脏穿刺收集用于血浆制备。

[0513] 另外,分离各种组织并称重。收集的肌肉是:腓肠肌、比目鱼肌、胫骨前肌、四头肌(股直肌)、趾长伸肌和膈肌。肌肉从研究小鼠的右腿和左腿两者切除。为进行分析,将来自两只腿的单个肌肉的重量组合并计算按克计的平均肌肉重量。收集的其它组织是:心脏、肾脏、脾脏、肝脏和脂肪组织。除左腓肠肌(其在福尔马林中固定用于组织学分析)外,所有组织称重并然后急冻。

[0514] 表14:用于剂量反应模型研究的处理组

处理组	测试品剂量	剂量#/周	总剂量/周	动物ID
1	PBS对照	2	0	1-8
2	IgG对照 (10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	9-16
3	Ab1 (10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	17-24
4	Ab1 (1mg/kg)	2	2mg/kg/wk	25-32
5	Ab1 (0.25mg/kg)	2	0.5mg/kg/wk	33-40
6	Ab2 (10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	41-48
7	Ab2 (1mg/kg)	2	2mg/kg/wk	49-56
8	Ab2 (0.25mg/kg)	2	0.5mg/kg/wk	57-64
9	Ab4 (10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	65-72
10	Ab4 (1mg/kg)	2	2mg/kg/wk	73-80
11	Ab4 (0.25mg/kg)	2	0.5mg/kg/wk	81-88
12	Ab6 (10mg/kg)	2	20mg/kg/wk	89-96
13	Ab6 (1mg/kg)	2	2mg/kg/wk	97-104
14	Ab6 (0.25mg/kg)	2	0.5mg/kg/wk	105-112

[0516] 用溶剂(PBS)、IgG对照及不同剂量的Ab1、Ab2、Ab4和Ab6处理的动物的平均百分瘦体重变化(相对于第0天)数据显示于图15中。用20mg/kg/wk剂量水平的Ab1、Ab2、Ab4和Ab6处理的动物与IgG对照和溶剂(PBS)处理的动物相比在第21天和第28天具有瘦体重的显著增加。用2mg/kg/wk剂量水平的Ab1和Ab2处理的动物在研究的第21和28天也具有瘦体重的显著变化。对于用0.5mg/kg/wk剂量水平的Ab1、Ab2、Ab4和Ab6处理的动物,没有相对于对照组的瘦体重的显著变化。

[0517] 在研究结束(第28天)时,收集肌肉并称重。四头肌(股直肌)和腓肠肌的重量在图

18A和18B中作图。用20mg/kg/wk剂量水平的Ab1、Ab2、Ab4和Ab6处理的动物与溶剂(PBS)处理的动物相比具有腓肠肌和四头肌(股直肌)肌肉重量的显著增加。用2mg/kg/wk剂量水平的Ab2和Ab4处理的动物也具有腓肠肌肌肉重量的显著变化。用2mg/kg/wk剂量水平的Ab2处理的动物也具有四头肌(股直肌)肌肉重量的显著变化。对于用0.5mg/kg/wk剂量水平的Ab1、Ab2、Ab4和Ab6处理的动物,相对于对照组没有肌肉质量的显著变化。用不同剂量的Ab1、Ab2、Ab4和Ab6处理的动物的腓肠肌和四头肌(股直肌)肌肉重量的百分差异(当与溶剂对照相比时)列于图18C中。

[0518] SCID小鼠中Ab1的作用研究的持续时间

[0519] 在SCID小鼠中测试了在单一剂量后和3个每周剂量后Ab1增加瘦体重的能力。八只(8)雌性SCID小鼠的七个(7)组在第0天(组1-4)或第0、7和14天每周一次(组5-7)通过腹膜内(IP)注射(10ml/kg)接受测试品施用。参见表15。抗体(IgG对照、Ab1和AbMyo)以10mg/kg给药。动物在研究开始时是10或11周龄。体重在整个研究中每周测量两次(对应于给药日)。身体质量组成参数(脂肪量、瘦体重和水含量)在第0、7、14和21天通过Echo MRI (QNM)测量。

[0520] 表15:处理组和给药频率。

处理组	测试品	剂量(mg/kg)	给药频率
1	PBS 对照	0	一次
2	IgG CTL	10	一次
3	Ab1	10	一次
4	AbMyo	10	一次
5	IgG CTL	10	一次 每周
6	Ab1	10	一次 每周
7	AbMyo	10	一次
			每周

[0523] 用溶剂(PBS)、IgG对照、Ab1、AbMyo处理的动物的平均百分瘦体重变化数据显示于图19中。数据表示为相对于研究的第0天的瘦体重变化。在单一剂量的测试品后21天时,用Ab1处理的动物(组3)具有显著的瘦体重增加(与IgG对照动物-组1相比),其与3个剂量的Ab1后的瘦体重变化(组6)不可区分。瘦体重的这些变化也与用单一剂量的AbMyo处理的动物(组4)或用3个周剂量的AbMyo处理的动物(组7)中看到的相当。

[0524] 实施例3:化学/药理学

[0525] Ab2是具有位置228处替代丝氨酸的脯氨酸的IgG4亚型的人源化单克隆抗体。这产

生IgG1-样铰链序列和最小化链间二硫键的不完全形成(这是IgG4的特征)。Ab2重链和轻链的完整氨基酸序列显示如下。互补决定区(CDR)加下划线。黑体的NST序列:N-连接的糖基化共有序列位点;黑体的DP序列是潜在的切割位点;黑体的NX序列,其中X可以是S、T或G,是潜在的脱酰胺位点;黑体的DX序列,其中X可以是G、S、T或SDG,是潜在的异构化位点;黑体的甲硫氨酸是潜在的甲硫氨酸氧化位点;黑体的Q是预期的N-末端焦谷氨酸(图21A-21B)。

[0526] Ab1的分子建模鉴定了几个翻译后修饰的潜在位点。轻链中的两个天冬酰胺和重链中的七个天冬酰胺易于脱酰胺。这些残基中的两个位于重链的CDR区内。

[0527] 原始IgG4 mAb可能具有重链间二硫键的不完全形成,其中两个半分子(各包含一个重链和一个轻链)通过非共价相互作用保持在完整抗体结构中。IgG4分子可能易发生体外和体内半分子的交换,且半分子的水平必须在制造批次间是一致的。IgG4结构的骨架中Ser至Pro的置换导致IgG1-样铰链序列,由此使得能够形成链间二硫键和显著地稳定抗体结构。铰链区的完整性和稳定性使用如非还原毛细管电泳和游离巯基的定量的这类分析在扩展表征的开发过程中监测。链交换的潜在在体内监测。

[0528] 总结

[0529] 本文提供了阻断原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素的激活的原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素特异性抗体。这一激活阻断抗体施用于健康小鼠增加瘦体重和肌肉大小,其中仅需要单剂量在1个月的时间内维持肌肉增强作用。另外,抗体施用在两种独立的肌肉萎缩模型中保护健康小鼠免于肌肉萎缩。数据证明阻断肌生长抑制素的激活促进稳健的肌肉生长和在体内防止肌肉萎缩,并代表了肌肉萎缩的治疗性干预的可选机制。

[0530] 实施例4:原-肌生长抑制素和潜伏-肌生长抑制素在肌肉萎缩中的分析

[0531] 进行蛋白质印迹以确定原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素在肌肉萎缩过程中以及在正常状况中在肌肉组织和在循环中的存在。肌肉萎缩的标准模型包括用2.5mg/kg/周地塞米松(在饮水中给药)处理小鼠,并在处理的2周后收集肌肉和血浆。这一模型经常地在治疗过程中导致肌肉质量的15-25%降低。同时从未用地塞米松处理的小鼠收集对照肌肉和血浆。切除股直肌、胫骨前肌和比目鱼肌、在液氮中速冻和在-80C下储存直到备用。肌肉溶解产物通过研磨接着在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的T-PER缓冲液中溶解来产生。血浆通过标准方法收集并在-80C下储存。

[0532] 包含相同浓度的蛋白质的多个样品通过PAGE凝胶和蛋白质印迹分离到PVDF膜上。对于肌肉溶解产物,10-50ng总蛋白加载到凝胶上。血浆在PBS中1:10稀释且10μl的各样品加载到凝胶上。作为尺寸标准物,0.1-1ng重组原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素也加载到凝胶上。肌生长抑制素蛋白的鉴定使用识别肌生长抑制素的前结构域的抗体(AF1539,R&D Systems)完成。这一分析显示原肌生长抑制素是肌肉中的支配形式,而潜伏肌生长抑制素是血浆中的主要形式(图25)。此外,经证明,在具有由地塞米松诱导的肌肉萎缩的小鼠中,原肌生长抑制素在肌肉组织中增加,而潜伏肌生长抑制素在血浆中降低。

[0533] 为确认这些结果,蛋白质印迹使用荧光标记和检测重复(Azure Biosystems)。定量了来自正常和地塞米松处理小鼠的血浆中及股直肌和胫骨前肌中各肌生长抑制素形式的相对水平。这些数据确认以上描述的结果,显示两种肌肉中原肌生长抑制素2-至2.5-倍的增加和血浆中潜伏肌生长抑制素2.3-倍的降低(图26)。

[0534] 基于这些数据,给出正常和患病肌肉中肌生长抑制素“流”的模型。如证明的,在正

常肌肉中(图28A),原肌生长抑制素在肌肉中产生并通过弗林蛋白酶的切割转化成潜伏肌生长抑制素,该蛋白酶可能存在于细胞内或细胞外(Anderson等,2008)。肌肉中某些部分的潜伏肌生长抑制素然后释放到循环中,从而形成潜伏肌生长抑制素的循环池。在肌肉萎缩中,产生活性肌生长抑制素生长因子的增加,从而驱动肌肉萎缩。这种增加被认为通过肌肉中原肌生长抑制素水平的上调和潜伏肌生长抑制素转化成活性生长因子的增加来引起(图28B)。此处概述的数据直接支持这一模型的第一步,表明肌肉中增加的原肌生长抑制素。数据也支持第二步,因为观察到地塞米松处理的小鼠中降低的肌肉质量,表明成熟肌生长抑制素产生增加而没有肌肉中潜伏肌生长抑制素的伴随增加。因此,血浆中肌生长抑制素的水平降低,表明对成熟肌生长抑制素的转化增加。

[0535] 实施例5:从鼠血清和肌肉组织的免疫沉淀

[0536] 进行免疫沉淀以确定循环中原肌生长抑制素的存在并研究Ab2和AbMyo与血清和肌肉中的内源肌生长抑制素前体的结合。Ab2识别肌肉中肌生长抑制素的主要形式。图27中显示的结果证明血清原肌生长抑制素的池随Ab2沉淀,表明具有体内存在的细胞外原肌生长抑制素。除与血清中的原肌生长抑制素、潜伏肌生长抑制素和肌生长抑制素的其它部分处理的形式结合外,Ab2从肌肉提取物免疫沉淀原肌生长抑制素。相反,AbMyo有效地结合血清中的潜伏肌生长抑制素和部分处理的前体,而没有与肌肉中原肌生长抑制素的可检测的相互作用。既然肌肉是其中肌生长抑制素信号传导发生的部位,这可以对于Ab2作用机制提供重要的优势。

[0537] 匀浆的肌肉溶解产物如下制备:冷冻的小鼠四头肌使用CryoPrep粉碎机(Covaris,Woburn MA)研磨。研磨的肌肉然后在具有1x HaltTM蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物而没有EDTA(ThermoFisher Scientific)的M-Per缓冲液(ThermoFisher Scientific)中重悬浮至50mg/mL的浓度。组织然后使用塑料杵(Bio-Plas Cat#4030-PB)冲击并进一步用平头移液管尖端的重复吸打来均质化。肌肉样品然后在4℃下伴随端对端旋转孵育30分钟。最后,样品以16,100g离心10分钟以沉淀不溶性部分。可溶性部分吸出并用于下游实验中。

[0538] 对于免疫沉淀,Ab2、IgG Ctl或AbMyo抗体使用Thermo Scientific PierceTMCo-Immunoprecipitation试剂盒按照制造商的说明书与琼脂糖珠共价偶联。75ug的各抗体与50uL的珠浆料偶联,且30ug的抗体用于各免疫沉淀中。免疫沉淀针对3mL的合并正常小鼠血清(Bioreclamation)或1.05mL的如上所述制备的均质化可溶性小鼠四头肌进行。抗体偶联的珠和样品在4℃下伴随端对端旋转孵育过夜。在孵育后,珠使用QIAvac 24Plus真空歧管(Qiagen)通过使整个样品体积经过包括在共免疫沉淀试剂盒中的旋转过滤器回收。珠然后用200uL的IP裂解/洗涤缓冲液洗涤3x,和按照试剂盒的说明用100μL的1x条件缓冲液洗涤一次。洗脱用50μL的洗脱缓冲液进行五分钟和然后在收集管中与5μL的1M Tris,pH 9.5混合。

[0539] 通过测试抗体拉下的肌生长抑制素物质利用AF1539,(R&D systems)ab124721、(Abcam)AlexaFluor®680AffiniPure驴抗-绵羊IgG(H+L),(Jackson ImmunoResearch)和IRDye®800CW驴抗-兔IgG(H+L)(LI-COR Biosciences)Thermo Scientific通过蛋白质印迹可视化。SEA BLOCK阻断缓冲液用于阻断和第一抗体孵育。

[0540] 实施例6:用Ab2处理的大鼠中增加的肌肉质量和改变的肌生长抑制素蛋白表达

[0541] 研究设计

[0542] 七至八周龄雌性Sprague-Dawley大鼠施用单一静脉内剂量的Ab2 (10mg/kg)、非功能性人IgG对照抗体 (10mg/kg) 或等体积的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在研究的过程中,血清在给药后的4小时、48小时、7天、14天、21天和28天从3只大鼠/组收集。收集通过标准方法进行且样品储存在-80℃下。瘦体重通过定量核磁共振(qNMR)在基线(第0天给药前)和在第7、14、21和28天时(8只大鼠/组)测量且骨骼肌(股直肌、胫骨前肌和比目鱼肌)在研究结束(第28天)时收集、称重和在液氮中速冻用于在-80℃下储存。

[0543] 结果

[0544] 药物暴露以已知量的各药物用作参照标准使用对于人IgG特异性的ELISA在血清样品中测量。如图29中所示,注射后4小时,Ab2和IgG对照抗体在大鼠血清中检测。随着研究进展,Ab2与IgG对照相比表现出升高的循环药物水平,在研究结束时血清中具有平均17.1μg/ml的药物。

[0545] Ab2处理的药效学作用通过在研究过程中测量瘦体重(通过qNMR)和通过测定在研究结束时切除的肌肉的重量来评价。图30A显示研究过程中的瘦体重测量,其中用Ab2处理的大鼠与用PBS或用人IgG对照抗体处理的大鼠相比显示出瘦体重的明显增加。肌肉质量通过在研究结束(28天)时收集和称重整个骨骼肌进行测量,如图30B中所示,用Ab2处理的大鼠分别显示股直肌和胫骨前肌肌肉质量14%和11%的增加。总的说来,这些数据表明大鼠用单一剂量的Ab2处理导致肌肉质量的持久增加。

[0546] 原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的相对水平通过肌肉溶解产物或血清样品的定量蛋白质印迹测定。肌肉溶解产物通过研磨接着在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的T-PER缓冲液中溶解从速冻的肌肉样品产生。在溶解后,包含相同浓度的蛋白质的样品通过PAGE凝胶分离并蛋白质印迹到低荧光PVDF膜上。对于肌肉溶解产物,10-50ng总蛋白加载到凝胶上。血浆在PBS中1:10稀释且10μl的各样品加载到凝胶上。作为尺寸标准物,0.1-1ng重组原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素也加载到凝胶上。肌生长抑制素蛋白的鉴定使用识别潜伏肌生长抑制素的前结构域的抗体(AF1539,R&DSYSTEMS),接着用荧光标记的第二抗体的检测来完成。对于所有蛋白质印迹分析,测定最少三个样品/组。

[0547] Ab2的处理在大鼠血清中与IgG对照处理的大鼠相比提高潜伏肌生长抑制素水平~20-倍(图31A)。这些数据与对于其它抗体药物观察到的作用一致,从而反映了循环中药物靶标的结合。在大鼠肌肉(股直肌)中,Ab2处理导致肌生长抑制素的潜伏形式1.9x的增加(vs. IgG对照处理的大鼠)。没有观察到原肌生长抑制素的统计学显著的变化。这些数据表明Ab2结合其靶标,原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素,并改变肌肉以及循环中的肌生长抑制素处理。还观察到Ab2处理增加大鼠肌肉中的潜伏原肌生长抑制素,但不增加原肌生长抑制素(图31B)。

[0548] 实施例7:用Ab2处理的小鼠中增加的肌肉质量和肌生长抑制素蛋白表达的改变及与比较抗-肌生长抑制素抗体的对比。

[0549] 研究设计

[0550] 十周龄雄性SCID小鼠施用单一腹腔内剂量(5mg/kg)的Ab2、非功能性人IgG对照抗体或通过阻断肌生长抑制素/受体相互作用发挥作用的比较抗体(AbMyo)。在研究的过程中,血清和骨骼肌在给药后的1小时、4小时、48小时、7天、14天、21天、28天和56天收集。血清

收集通过标准方法进行且样品储存在 -80°C 下。收集骨骼肌(股直肌、胫骨前肌和比目鱼肌)、称重和在液氮中速冻用于在 -80°C 下储存。瘦体重通过定量核磁共振(qNMR)在基线(第0天给药前)和在整个研究过程中每周测量。

[0551] 结果

[0552] Ab2处理的药效学作用通过在研究过程中测量瘦体重(通过qNMR)来评价。图32显示研究过程中的瘦体重测量,其中用Ab2处理的小鼠与用人IgG对照抗体处理的小鼠相比显示出瘦体重的明显增加。对于研究的前三周,用比较抗体(AbMyo)处理的小鼠显示与Ab2组等同的瘦体重增加。但是,到给药后28天,AbMyo处理的小鼠不维持增加的瘦体重。相反,Ab2处理组中的小鼠在研究的整个持续期间(56天)保持其增加的瘦体重。这些数据表明Ab2具有比AbMyo更长的作用持续时间。

[0553] 药物暴露以已知量的各药物用作参照标准使用对于人IgG特异性的ELISA在血清样品中测量。如图33中所示,早至注射后1小时,Ab2和比较抗体(AbMyo)两者在血清中检测且两种抗体 $>1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的水平可以在整个研究中检测到。但是,Ab2与AbMyo相比表现出显著更长的半衰期和推测的曲线下面积(AUCINF),从而表明在相似的剂量下,Ab2与AbMyo相比表现出显著更大的暴露量。

[0554] 原肌生长抑制素和潜伏肌生长抑制素的相对水平通过肌肉溶解产物或血清样品的定量蛋白质印迹测定。肌肉溶解产物通过研磨接着在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的T-PER缓冲液中溶解从速冻的肌肉样品产生。在溶解后,包含相同浓度的蛋白质的样品通过PAGE凝胶分离并蛋白质印迹到低荧光PVDF膜上。对于肌肉溶解产物,10-50ng总蛋白加载到凝胶上。血浆在PBS中1:10稀释且10 μl 的各样品加载到凝胶上。作为尺寸标准物,0.1-1ng重组原肌生长抑制素和/或潜伏肌生长抑制素也加载到凝胶上。肌生长抑制素蛋白的鉴定使用识别潜伏肌生长抑制素的前结构域的抗体(AF1539, R&D Systems),接着用荧光标记的第二抗体的检测来完成。对于所有蛋白质印迹分析,测定最少三个样品/组。

[0555] 血清肌生长抑制素在药物处理的小鼠中和对照中使用荧光蛋白质印迹测量。尽管具有增加的Ab2血清暴露,Ab2-和AbMyo-处理的小鼠两者中的血清潜伏肌生长抑制素水平是相似的(图34)。这些数据表明游离药物(未结合于靶标)的循环水平充分高于靶标的水平,以使得提高的Ab2血清暴露不转化成与对于AbMyo观察到的循环潜伏肌生长抑制素增加相比更大的循环潜伏肌生长抑制素增加。

[0556] 肌肉(股直肌)中的肌生长抑制素水平也通过荧光蛋白质印迹评估。潜伏肌生长抑制素和原肌生长抑制素的相对水平在小鼠肌肉溶解产物中通过荧光蛋白质印迹测量。潜伏肌生长抑制素在Ab2和AbMyo处理的肌肉两者中升高(图35A)。但是,AbMyo处理的肌肉中潜伏肌生长抑制素的升高到第28天返回到基线,而Ab2处理的肌肉中潜伏肌生长抑制素的升高保持升高直到至少这一时间($P<0.003$ vs. AbMyo处理)。类似的趋势对于原肌生长抑制素观察到(图35B),尽管差异不是统计学显著的($P=0.068$)。这些数据表明Ab2在药物作用部位(骨骼肌)处更长的作用持续时间。

[0557] 实施例8: Ab2提高肌力产生。

[0558] 在这一实施例中,评估了Ab2对肌力产生的作用。简言之,雄性C57BL/6J小鼠每周一次腹膜内施用IgG(20mg/kg)、具有小鼠IgG1同种型的恒定区的Ab2(20mg/kg)或PBS,持续4周($n=10$ /组)。

[0559] 在研究结束时,肌肉切除并称重,且趾长伸肌(EDL)肌肉的体外肌肉性能在体外用适应于横向灌注浴的305C肌肉杠杆系统(Aurora Scientific Inc.,Aurora,CAN)测量。肌肉置于冰冷的生理缓冲溶液中且缝合丝线绑扎到近端肌腱。肌肉置于305C肌肉杠杆系统的横向浴中并用以95%O₂/5%CO₂氧合和保持在37℃下的生理缓冲液灌注。

[0560] 缝线在一侧绑扎到固定柱,且杠杆臂绑扎到另一侧。0.01Hz频率的一系列的1Hz和100Hz场刺激(0.2ms脉冲,100ms持续时间)通过肌肉侧翼的铂电极递送以确保缝线是拉紧的和最大发生力是稳定的。一旦稳定,测量直接肌肉刺激-力vs.频率。铂丝线电极在肌腹近端和远端放置。

[0561] 抽搐张力用1ms脉冲监测且电压提高直到获得最大力。一系列刺激(1ms脉冲,250ms训练持续时间)然后以提高的刺激频率进行:1、10、20、40、60、80、100、150Hz,接着是1Hz的最终刺激。

[0562] 如图36A中所示,在用Ab2处理4周后,肌肉质量和功能提高。平均EDL重量增加33%,且平均腓肠肌和四头肌重量增加19%。

[0563] 如图36B中所描述的,最大力产生在Ab2的4个周剂量后增加30%。

[0564] 尽管本公开的几个实施方式已经在本文中描述和阐明,但本领域技术人员很容易设想多种用于执行功能和/或获得本文所述的结果和/或一种或多种优势的其它方式和/或结构,且这样的变化和/或改进各自认为在本公开的范围内。更一般地,本领域技术人员很容易理解,本文所述的所有参数、尺寸、材料和构造意味着是示例性的且实际的参数、尺寸、材料和/或构造将取决于本公开的教导所使用的一种或多种特定的应用。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验确定与本文所述的本公开特定实施方式的许多等同物。因此,应理解前述实施方式仅通过举例的方式给出,且在所附权利要求及其等同的范围内,本公开可以以所特别描述和要求保护的方式以外的方式实施。本公开涉及本文所述的各单个特征、系统、物品、材料和/或方法。另外,如果这样的特征、系统、物品、材料和/或方法不是相互矛盾的,则两种或更多种这样的特征、系统、物品、材料和/或方法的任何组合包括在本公开的范围内。

[0565] 如在本文中说明书和权利要求中使用的冠词“一个”和“一种”,除非明确地表明相反的情况,应当理解为是指“至少一个(种)”。

[0566] 如本文中使用的,说明书和权利要求中的短语“和/或”应当理解为是指如此连结的元素(即在一些情况中结合地呈现和在其它情况中分别地呈现的元素)中的“任一或两者”。除非明确地表明相反的情况,可以任选地提出特别地通过“和/或”从句指定的元素以外的其它元素,无论是否与这些特别指定的元素相关或不相关。因此,作为非限制性实例,“A和/或B”的引用在与开放式术语如“包含”结合使用时,在一个实施方式中,可以指A而没有B(任选地包括B以外的元素);在另一实施方式中,可以指B而没有A(任选地包括A以外的元素);在再另一个实施方式中,可以指A和B两者(任选地包括其它元素);等等。

[0567] 如本文中使用的,在说明书和权利要求中,“或”应当理解为与如上定义的“和/或”具有相同的含义。例如,当分隔列表中的项目时,“或”或者“和/或”应解释为是包含性的,即包括多个或一系列元素中的至少一个,但也包括超过一个,且任选地包括另外的未列举元素。仅明确表明相反的术语如“仅其中之一”或“恰好其中之一”或者,在用于权利要求中时,“由…组成”是指包括多个或一系列元素中的恰好一个元素。一般地,如本文中使用的,术语

“或”前面有排它性的术语如“任一”、“之一”、“仅之一”或“恰好之一”时仅应当解释为指示排它性的可选方式(即,“一个或另一个而非两者”)。“基本上由…组成”在用于权利要求中时应当具有如用于专利法领域中时的普通含义。

[0568] 如本文中使用的,在说明书和权利要求中,关于一系列的一个或多个元素的短语“至少一个”应当理解是指选自元素列表中的任何一个或多个元素的至少一个元素,但不必然地包括元素列表内特别列出的各个和每个元素中的至少一个且不排除元素列表中元素的任何组合。这一定义也允许可以任选地存在短语“至少一个”所指的元素列表内特别指定的元素以外的元素,无论是否与特别指定的那些元素相关或不相关。因此,作为非限制性实例,“A和B的至少一个”(或等同地,“A或B的至少一个”,或等同地,“A和/或B的至少一个”),在一个实施方式中,可以指至少一个A,任选地包括超过一个A,而不存在B(和任选地包括B以外的元素);在另一实施方式中,可以指至少一个B,任选地包括超过一个B,而不存在A(和任选地包括A以外的元素);在再另一个实施方式中,可以指至少一个A,任选地包括超过一个A,和至少一个B,任选地包括超过一个B,(和任选地包括其它元素);等等。

[0569] 在权利要求中以及在以上说明书中,所有连接词如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“容纳”等理解为开放式的,即意味着包括但不限于。仅连接词“由…组成”和“基本上由…组成”应当分别是封闭式或半封闭式的连接词,如在United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures,Section 2111.03中示出的。

[0570] 权利要求中用于修饰权利要求元素的序数术语如“第一”、“第二”、“第三”等的使用本身不意味着任何优先级、优先序或一个权利要求元素相对于另一元素的顺序或执行方法的动作的时间顺序,而是仅用作区分具有特定名称的一个权利要求元素与另一具有相同名称的元素的标记(仅对于序数术语的使用)以区分权利要求元素。

序列表

<110> Scholar Rock, Inc.

<120> 抗-原肌生长抑制素/潜伏肌生长抑制素抗体及其用途

<130> S1918.70001W000

<140> 未指定

<141> 与此同时

<150> US 62/219,094

<151> 2015-09-15

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

[0001] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 3

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0002] <223> 合成多肽

<400> 4

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 5

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 6

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0003]

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 7

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 8

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn
1 5

[0004]

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His
1 5 10

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 14

Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His
1 5 10

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

[0006]

<400> 15

Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 16

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr Val His
1 5 10

<210> 17
<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

[0007]

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 19

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Ser Asp Asn

1

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Ser Asp Asp

1

[0008]

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu Asn Gly Val
1 5 10

<210> 24

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

[0009]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0010]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 26

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0011]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0012]

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 28

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0013]

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 29
<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0014]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 30

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 30

Gln	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn
			20					25					30		

Thr	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40					45			

Ile	Tyr	Ser	Asp	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

[0015]

Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln
65					70					75				80	

Ser	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu
			85						90					95	

Asn	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu
			100						105			

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 31

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

[0016]

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

[0017]

<210> 33
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 33

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 34

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

[0018]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 35

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 35

[0019] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 36
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0020]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 37
<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 37

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

[0021] Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly

<210> 38

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

	<400> 38	
	cagatccagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc	300
	ctgggtcgat ttttggagtg gtcgcactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	360
	acggtcaccg tctcctca	378
	<210> 39	
	<211> 378	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0022]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 39	
	cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc	300
	ctgggtcgat ttttggagtg gtcgcactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	360
	acggtcaccg tctcctca	378
	<210> 40	
	<211> 378	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	40	
	cagatccagc	tggtgcagtc	tgggggaggc
	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc
			60
	tcctgtgcag	cgctcggatt	cgcccttcagt
	agctatggca	tgcactgggt	ccgccaggct
			120
	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt
	atatcatatg	atggaagtat	caaatactat
			180
	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc
	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat
			240
	ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac
	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatctc
			300
	ctggtgcgat	ttttggagtg	gtcgcacaaag
	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc
			360
	acggtcaccg	tctcctca	
			378
[0023]	<210>	41	
	<211>	378	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	41	
	caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc
	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc
			60
	tcctgtgcag	cgctcggatt	cgcccttcagt
	agctatggca	tgcactgggt	ccgccaggct
			120
	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt
	atatcatatg	atggaagtat	caaatactat
			180
	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc
	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat
			240
	ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac
	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatctc
			300
	ctggtgcgat	ttttggagtg	gtcgcacaaag
	tacggtatgg	acgtctgggg	ccaagggacc
			360
	acggtcaccg	tctcctca	
			378

<210> 42
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 42
 cagatccagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300
 ctgggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

[0024]

<210> 43
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 43
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300
 ctgggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

	acggtcaccg tctcctca	378
	<210> 44	
	<211> 327	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 44	
	cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcgccccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggtcctaa gtctggcacc tcagcctccc tggatcatcag tgggctccag	240
	tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggggtgttc	300
[0025]	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
	<210> 45	
	<211> 327	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 45	
	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcgccccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggtcctaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggggtgttc	300

	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
<210>	46	
<211>	327	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	46	
	cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgac agcgccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggatcatcag tgggctccag	240
	tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300
[0026]	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
<210>	47	
<211>	327	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	47	
	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgac agcgccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300

	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
<210>	48	
<211>	327	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	48	
	cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggaaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgac agcgccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggatcatcag tgggtccag	240
	tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300
[0027]	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
<210>	49	
<211>	327	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	49	
	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggaaatactg tccactggta ccagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgac agcgccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc	300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta

327

<210> 50

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0028] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	
	130						135					140					
	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
	145					150					155					160	
	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
					165					170					175		
	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				180					185						190		
	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	
		195						200					205				
[0029]	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	
	210						215					220					
	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	
	225					230					235					240	
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
					245					250					255		
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
				260						265					270		
	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
		275						280					285				
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	
	290						295					300					

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

[0030] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Gly
450

<210> 51

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

[0031] Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

[0032]

<210> 52
<211> 352
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala
20 25 30

Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn
35 40 45

Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu
50 55 60

Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp

65	70	75	80
Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile	85	90	95
Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly Lys Pro	100	105	110
Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val	115	120	125
Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr	130	135	140
Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly	145	150	155
Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly	165	170	175
Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp	180	185	190
Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp	195	200	205
Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp	210	215	220
Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg	225	230	235
Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser			240

[0033]

245

250

255

Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp
260 265 270

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly
275 280 285

Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
290 295 300

His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr
305 310 315 320

Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile
325 330 335

[0034]

Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
340 345 350

<210> 53
<211> 352
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 53

Asn Glu Asp Ser Glu Arg Glu Ala Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Asn Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Glu Ala
20 25 30

Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn
35 40 45

	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu	
	50						55					60					
	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	
	65					70					75					80	
	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	
					85					90					95		
	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Met	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	
				100					105						110		
	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	
			115						120					125			
[0035]	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Ala	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	
	130						135						140				
	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Gly	
					165					170					175		
	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	
					180					185					190		
	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	
			195					200					205				
	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	
	210						215					220					

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
225 230 235 240

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser
245 250 255

Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp
260 265 270

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly
275 280 285

Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
290 295 300

[0036] His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr
305 310 315 320

Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile
325 330 335

Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
340 345 350

<210> 54

<211> 352

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 54

Asn Glu Gly Ser Glu Arg Glu Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys
1 5 10 15

	Asn	Ala	Cys	Ala	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	
					20				25					30			
	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	
		35						40					45				
	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu	
		50					55					60					
	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	
	65					70				75						80	
	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	
					85					90					95		
[0037]	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Met	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	
					100				105					110			
	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	
					115				120					125			
	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	
		130					135					140					
	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Gly	
					165					170					175		
	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	
					180					185				190			

Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp
195 200 205

Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp
210 215 220

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
225 230 235 240

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser
245 250 255

Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp
260 265 270

[0038] Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly
275 280 285

Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
290 295 300

His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr
305 310 315 320

Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile
325 330 335

Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
340 345 350

<210> 55

<211> 277

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 55

Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys
1				5					10					15	

Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala
			20					25					30		

Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn
	35						40					45			

Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu
	50					55					60				

[0039]

Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp
65					70					75				80	

Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile
				85					90					95	

Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Met	Gln	Val	Asp	Gly	Lys	Pro
			100					105						110	

Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val
			115				120					125			

Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Thr
			130			135					140				

Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly
145					150					155				160	

Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly
165 170 175

Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp
180 185 190

Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp
195 200 205

Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp
210 215 220

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
225 230 235 240

[0040]

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser
245 250 255

Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp
260 265 270

Asp Trp Ile Ile Ala
275

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 56

Arg Ser Arg Arg

1

	<210>	57
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成多肽
	<400>	57
	Arg Val Arg Arg	
	1	
	<210>	58
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0041]	<220>	
	<223>	合成多肽
	<400>	58
	Cys Pro Pro Cys Pro	
	1 5	
	<210>	59
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成多肽
	<400>	59
	His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val	
	1 5 10 15	

Ser

<210> 60

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 60

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

[0042]

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 62

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 62

Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln
1 5 10 15

[0043]

Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala
20 25 30

Thr

<210> 63

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 63

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
1 5 10 15

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser
20 25 30

Arg Cys

<210> 64

<211> 80

<212> PRT

<213> 合成多核苷酸

<400> 64

Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu
1 5 10 15

Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr Lys Ser Ser Arg
20 25 30

[0044]

Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr
35 40 45

Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala
50 55 60

Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp
65 70 75 80

<210> 65

<211> 418

<212> PRT

<213> 合成多核苷酸

<400> 65

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Ser Gly Val Leu Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys His His
20 25 30

His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ala Glu Gly Pro
35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly
50 55 60

Gly Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp
65 70 75 80

Gly Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu
85 90 95

[0045] Glu Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala
100 105 110

Pro Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro
115 120 125

Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser
130 135 140

Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr
145 150 155 160

Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly
165 170 175

Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn
180 185 190

Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr
195 200 205

Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys
210 215 220

Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn
225 230 235 240

Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln
245 250 255

Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala
260 265 270

[0046] Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly
275 280 285

Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro
290 295 300

Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser
305 310 315 320

Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe
325 330 335

Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys
340 345 350

Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His
355 360 365

Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr
370 375 380

Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln
385 390 395 400

[0047]

Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly
405 410 415

Cys Ser

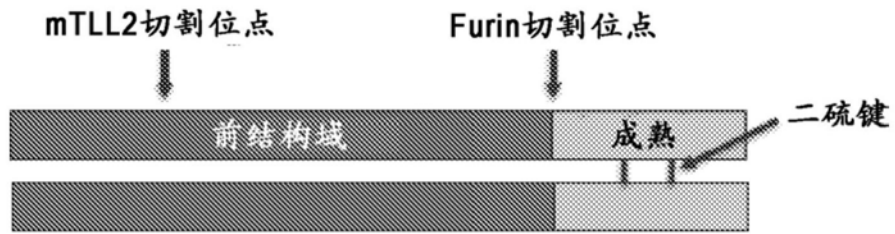


图1A

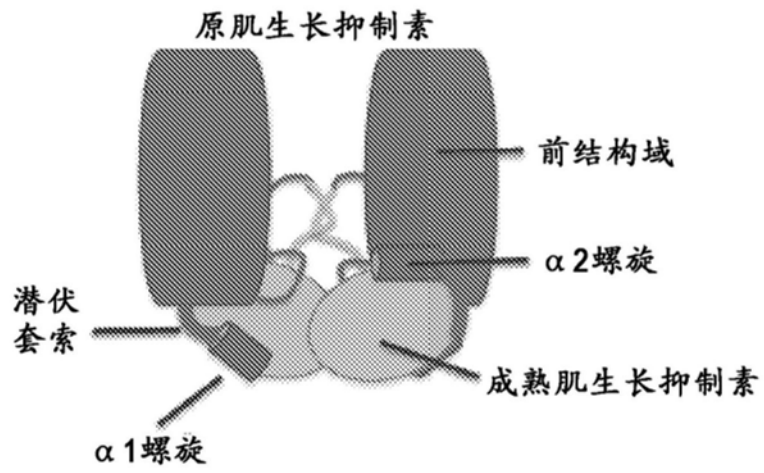


图1B

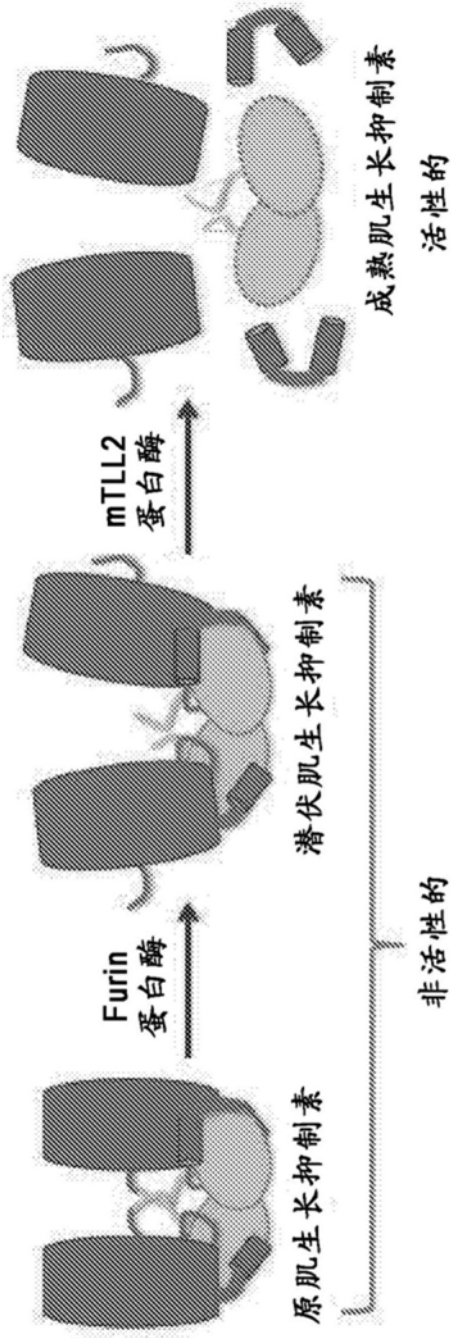


图2

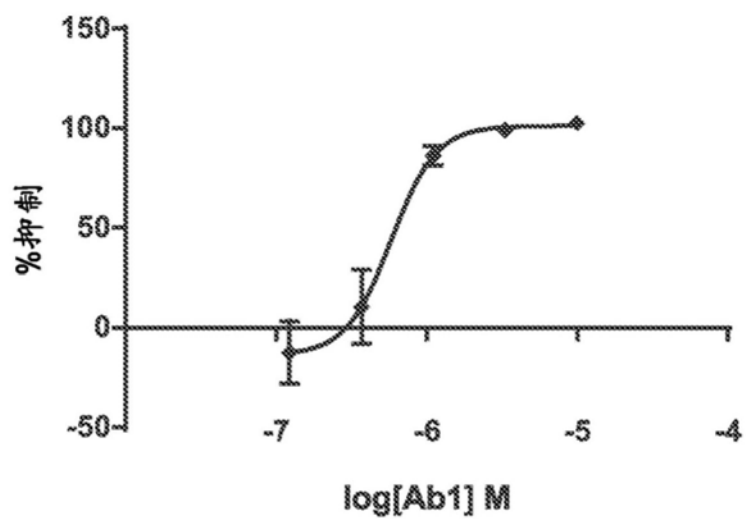


图3A

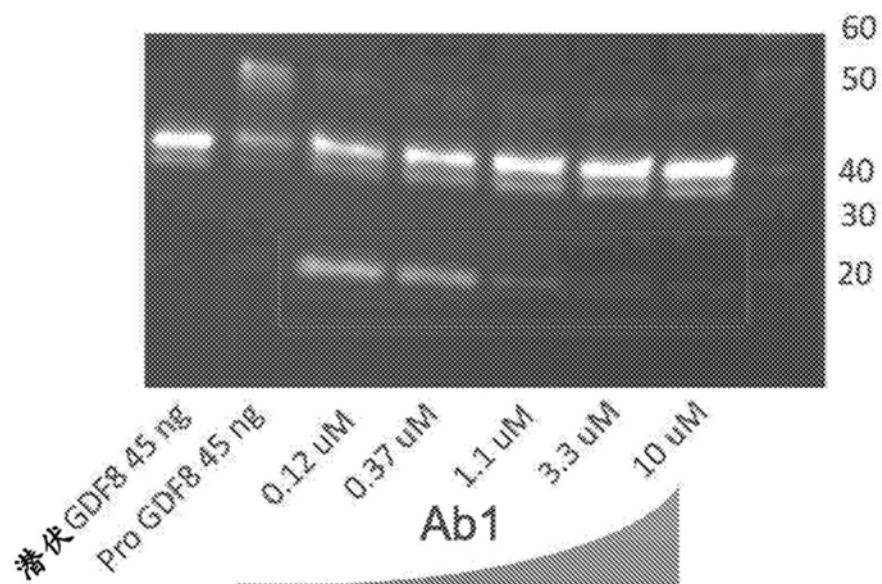


图3B

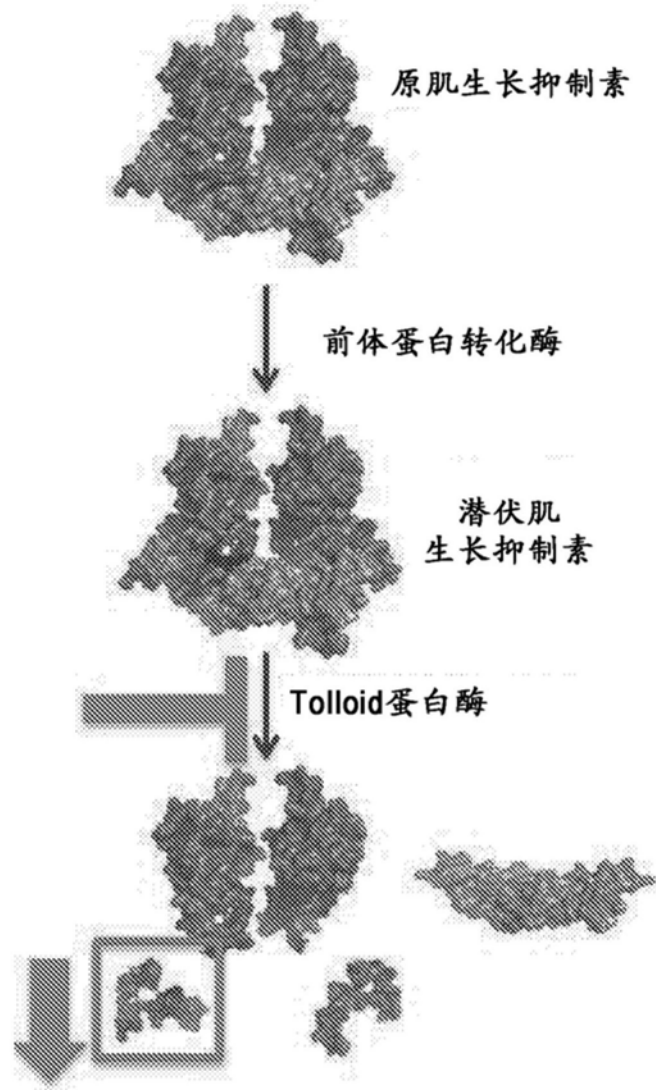


图3C

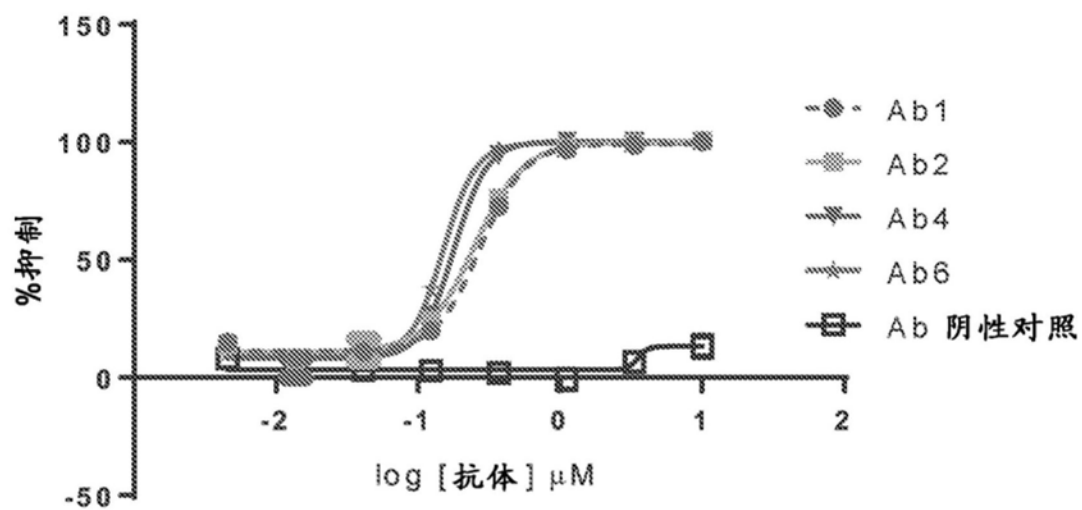


图4

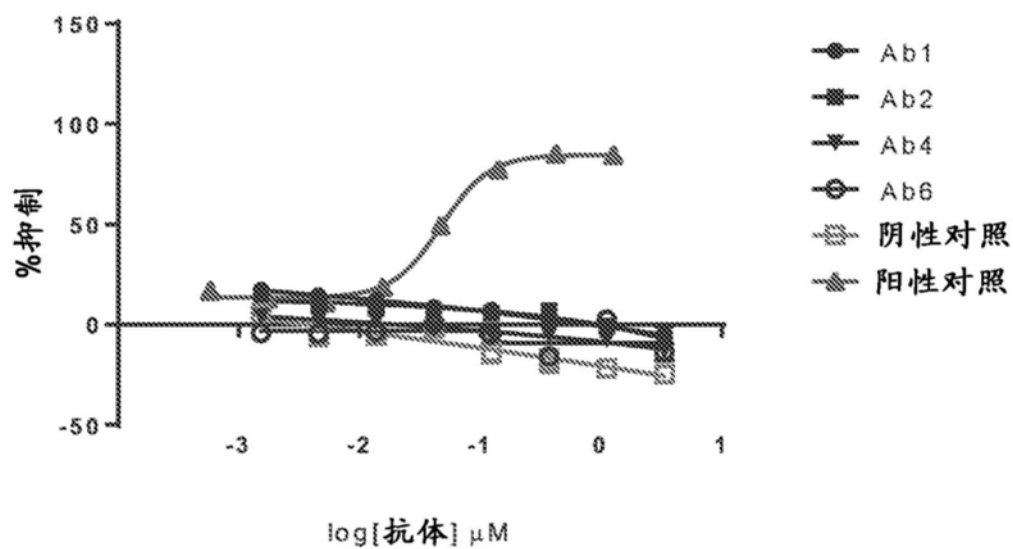


图5

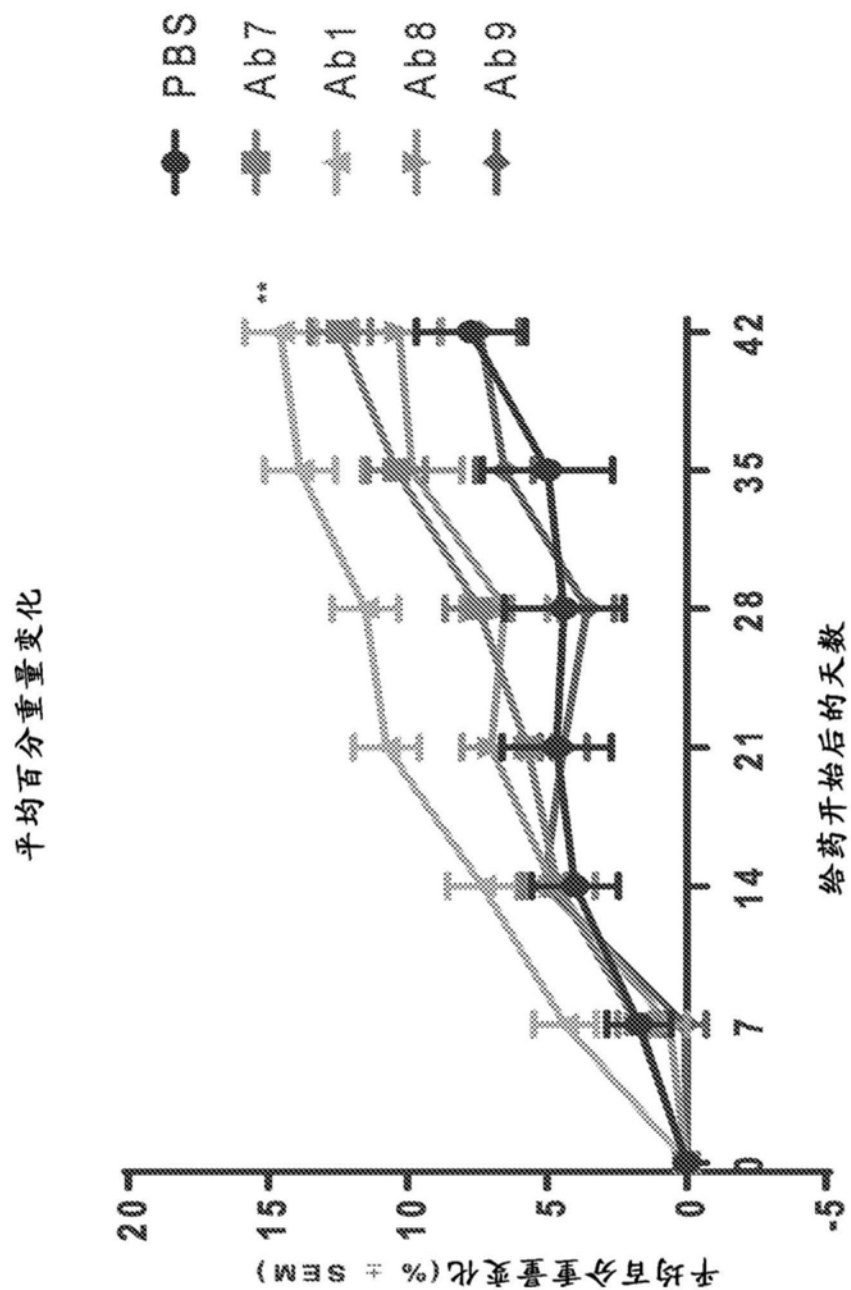


图6

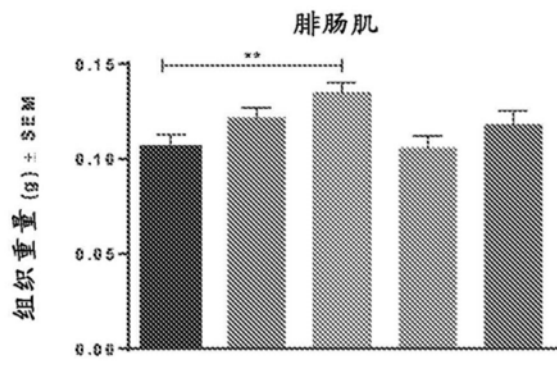


图 7A

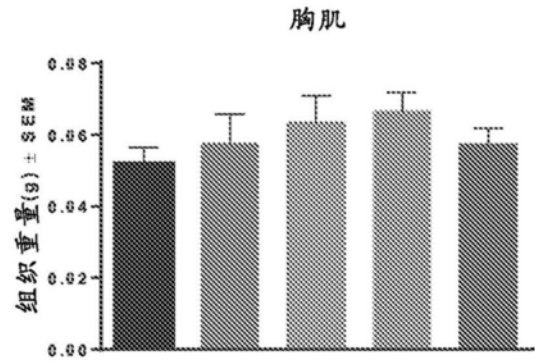


图 7B

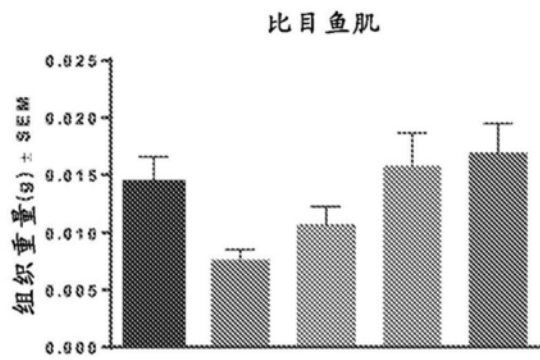


图 7C

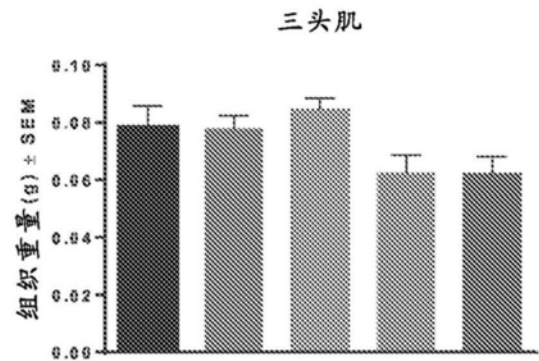


图 7D

- 组 1: 溶剂对照
- ▨ 组 2: Ab7 (25mg/kg)
- ▧ 组 3: Ab1 (25mg/kg)
- ▩ 组 4: Ab8 (25mg/kg)
- 组 5: Ab9 (25mg/kg)

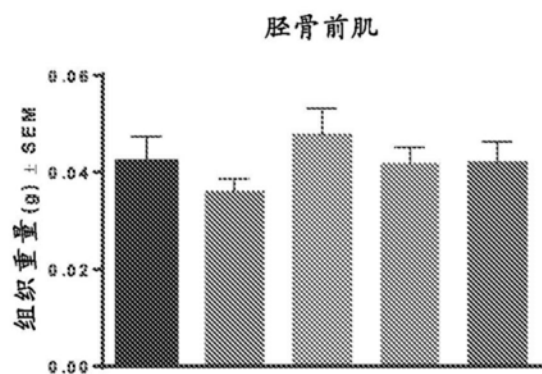


图 8A

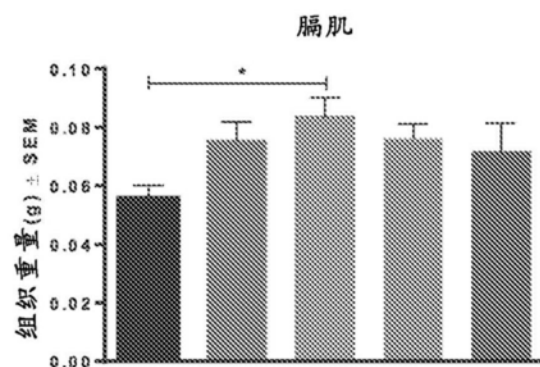


图 8B

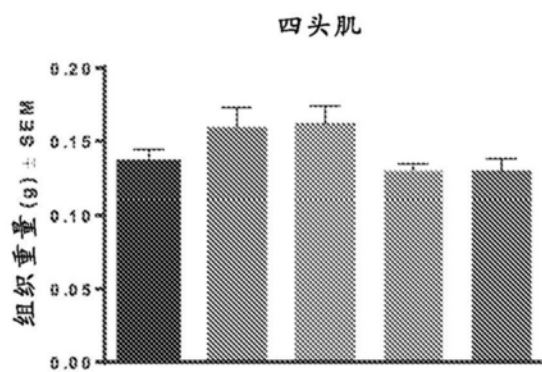


图 8C

- 组 1: 溶剂对照
- 组 2: Ab7 (25mg/kg)
- 组 3: Ab1 (25mg/kg)
- 组 4: Ab8 (25mg/kg)
- 组 5: Ab9 (25mg/kg)

平均百分重量变化

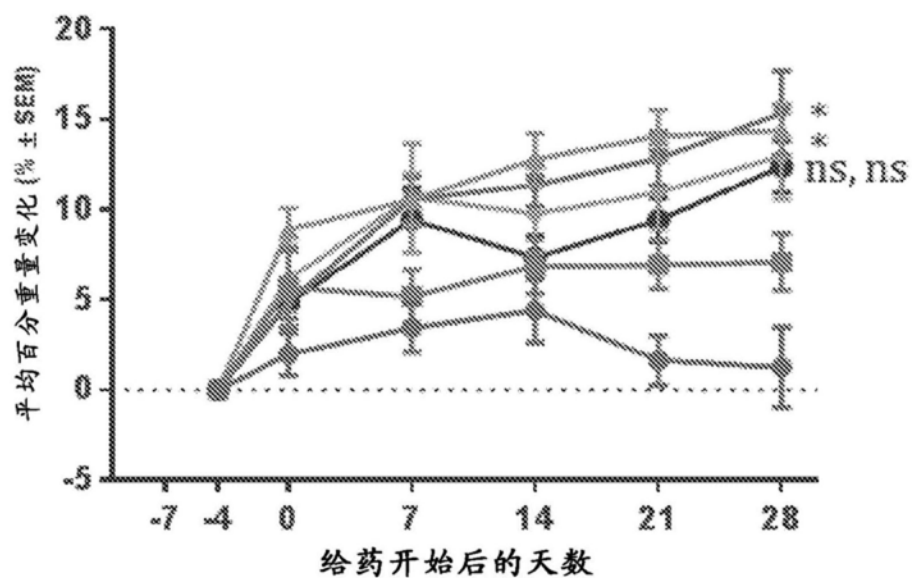


图 9A

- PBS
- IgG ctrl (60 mg/kg/wk)
- ▲ Ab1 (60 mg/kg/wk)
- ◆ Ab1 (20 mg/kg/wk)
- × Ab1 (6 mg/kg/wk)
- Ab1 (2 mg/kg/wk)

平均百分瘦体重变化

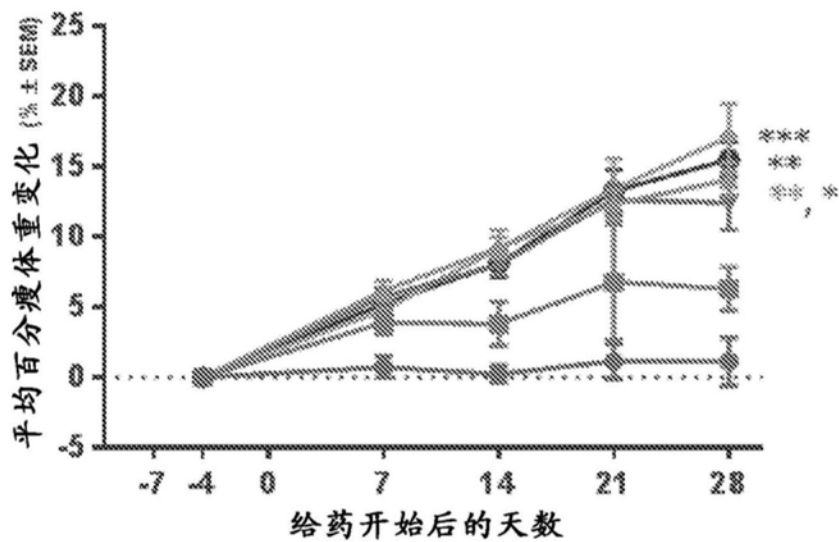


图 9B

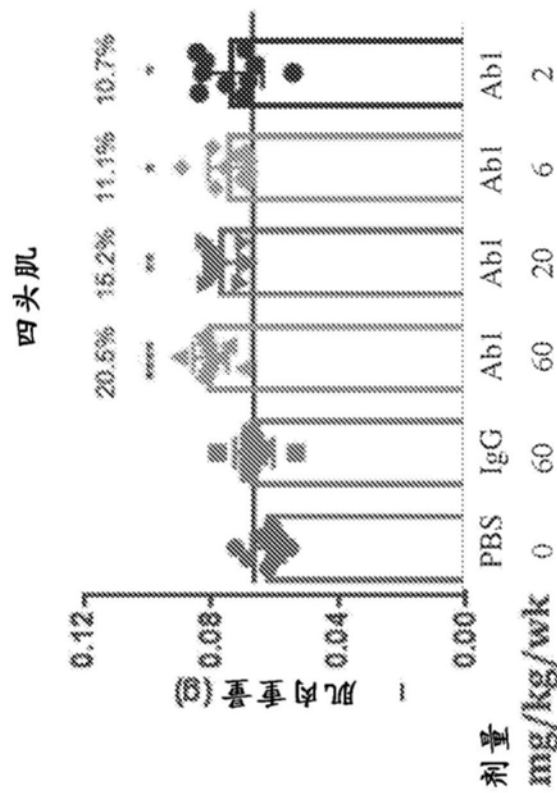


图10A

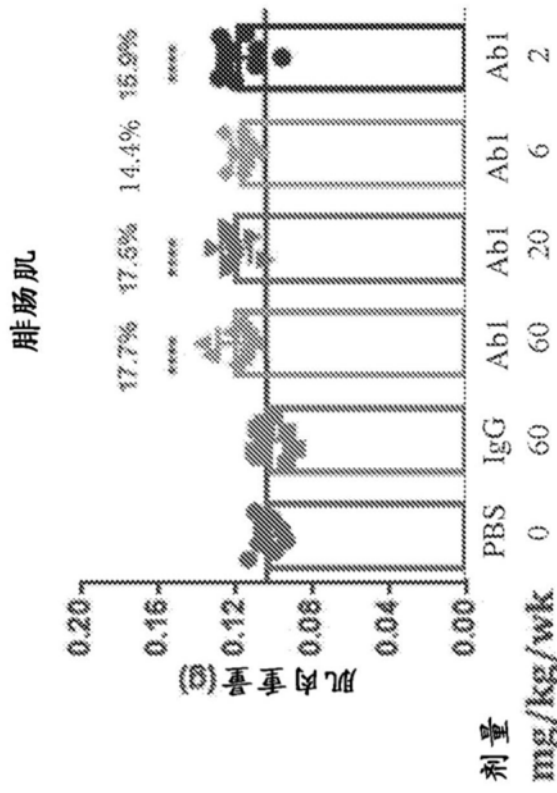


图10B

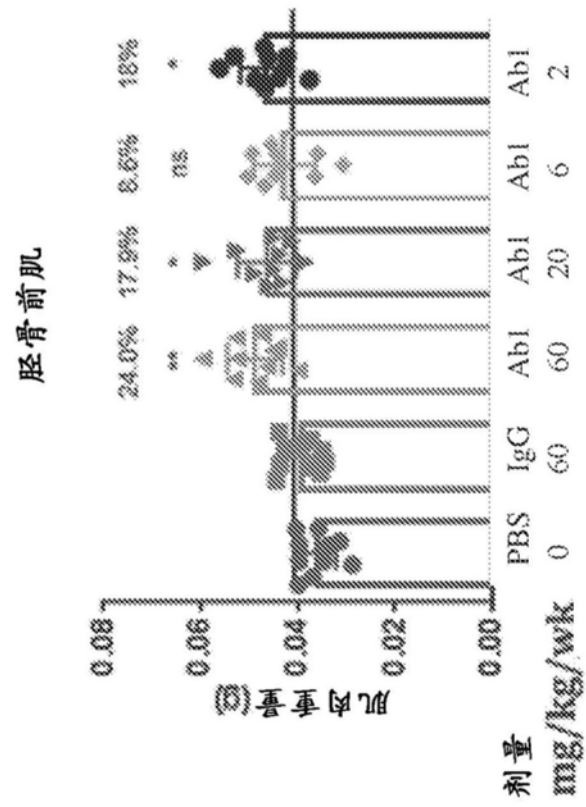


图10C

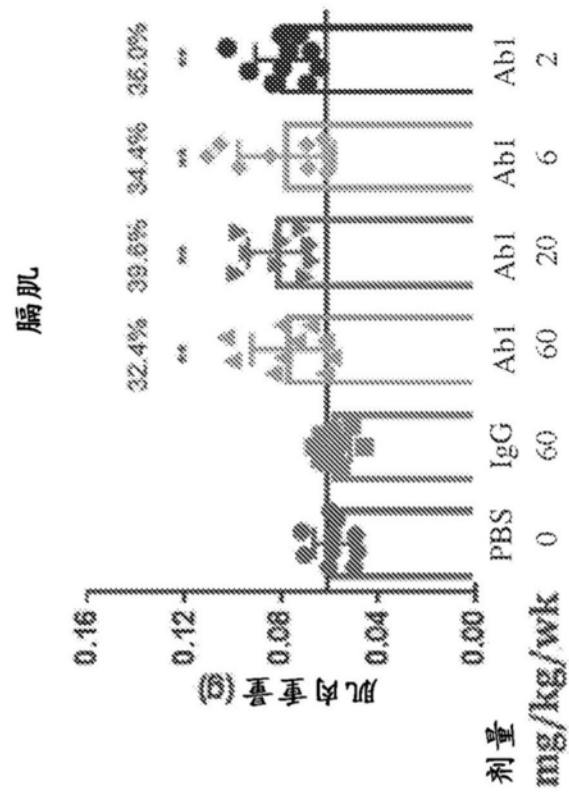


图10D

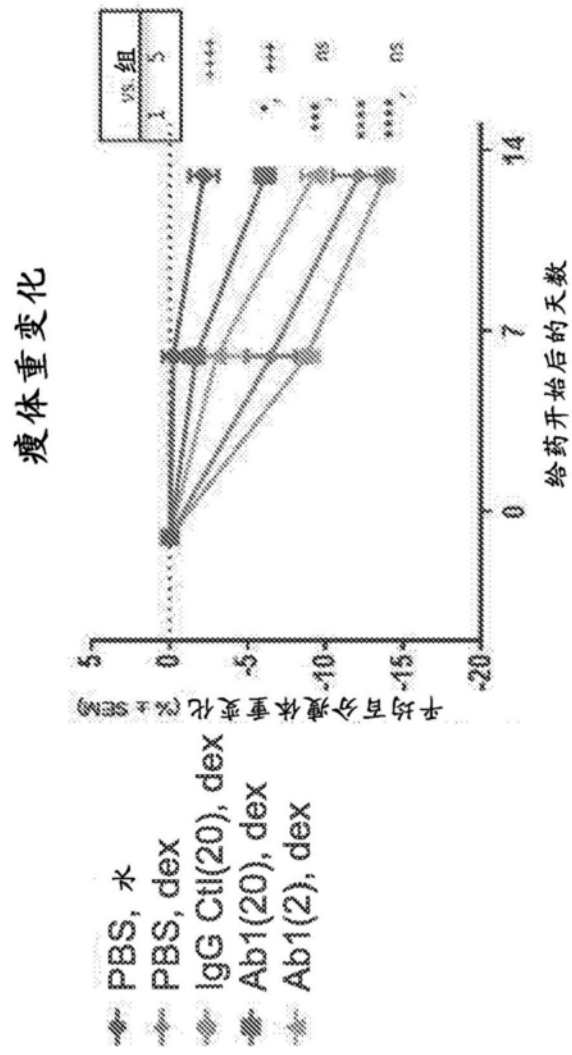


图 11B

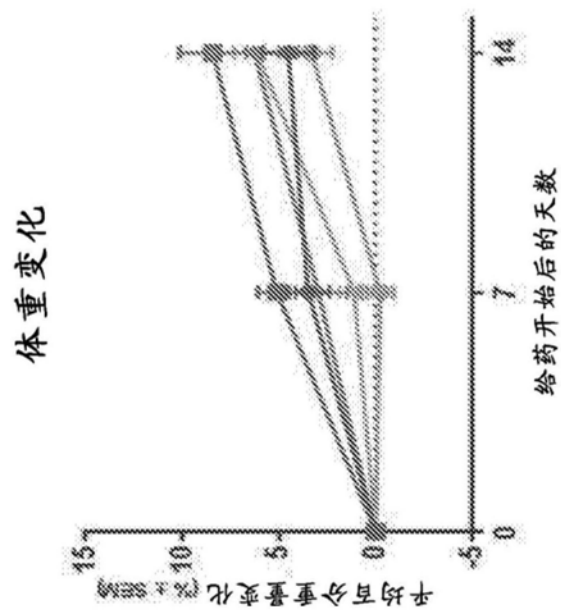
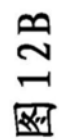
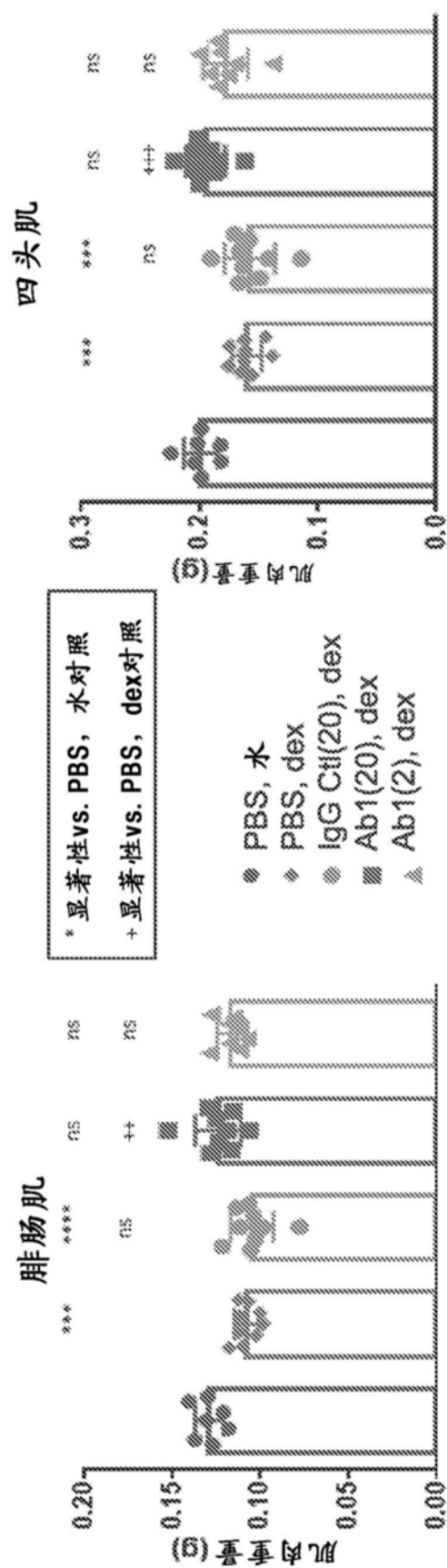


图 11A



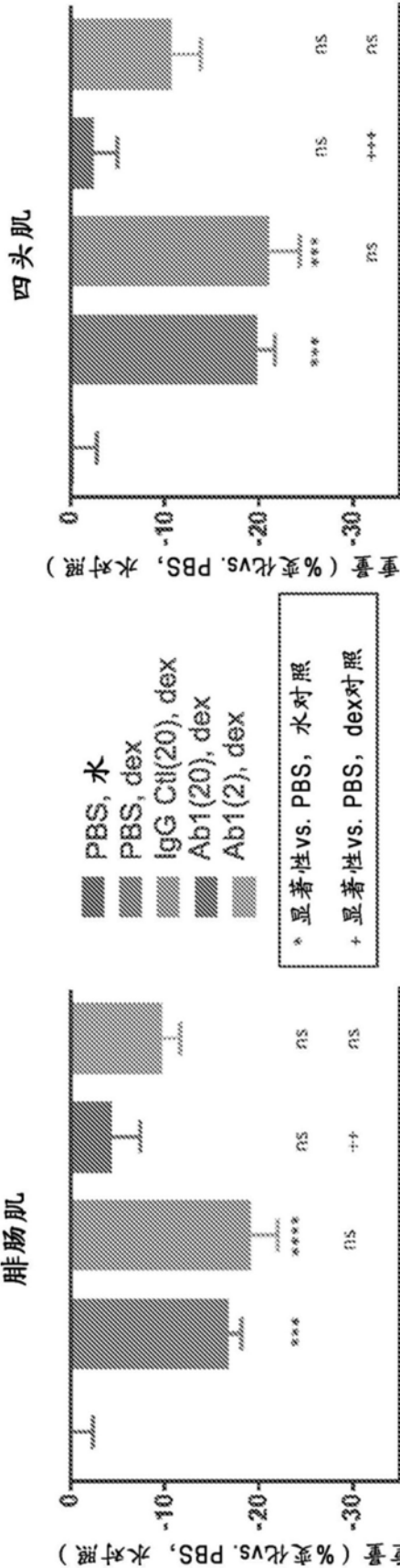


图12C

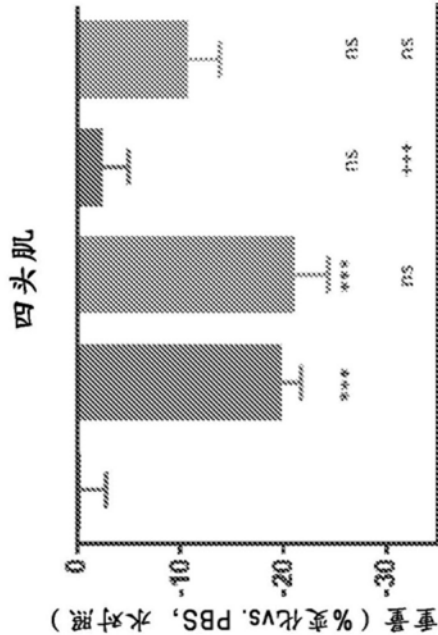


图12D

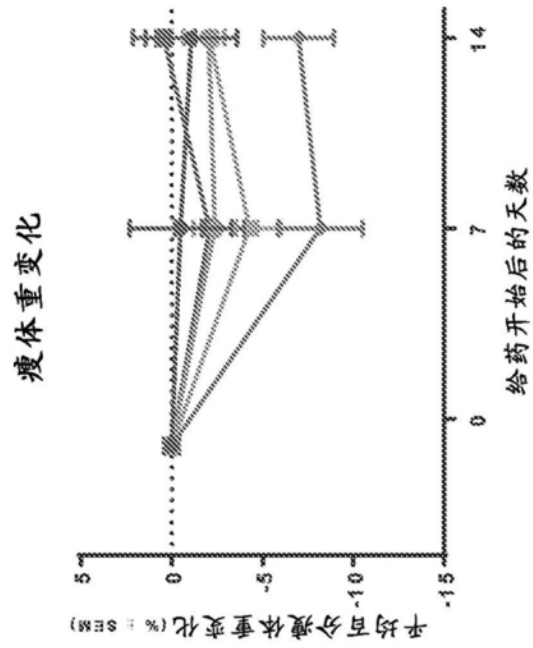


图 13B

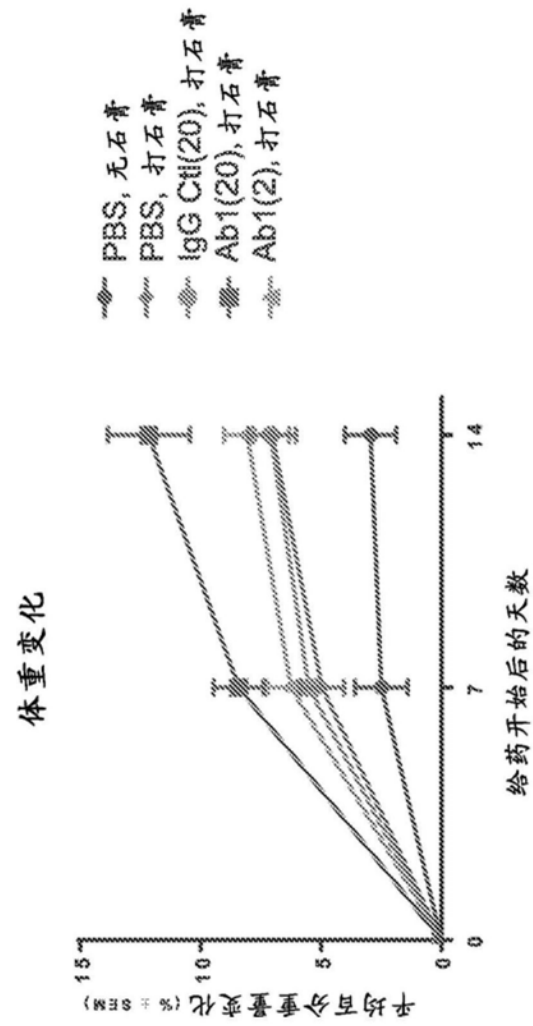


图 13A

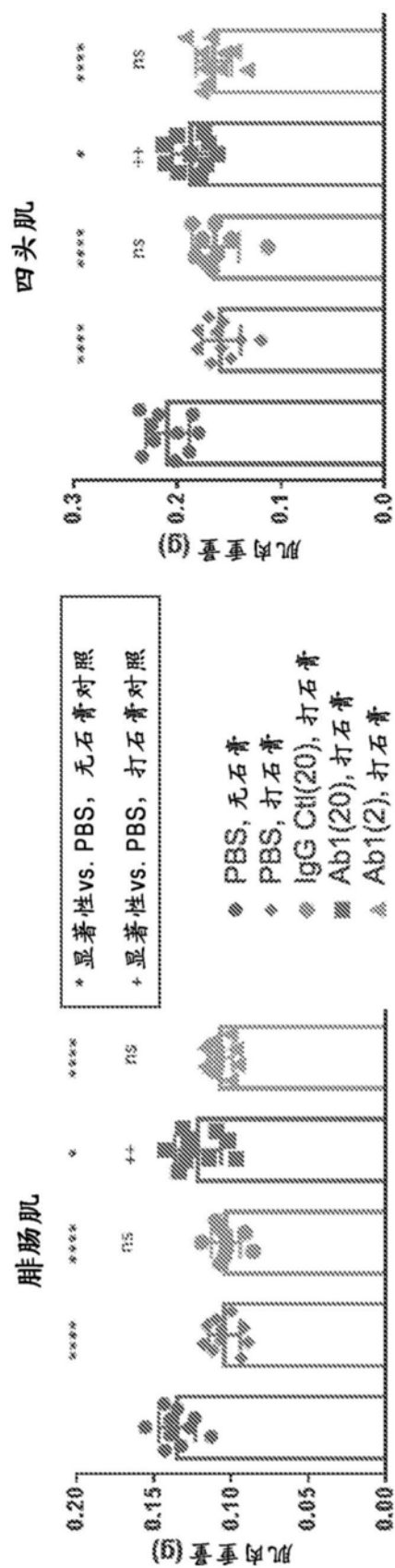


图14A

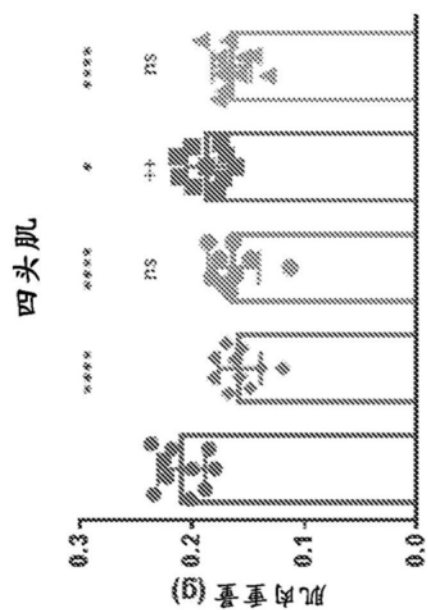


图 14B

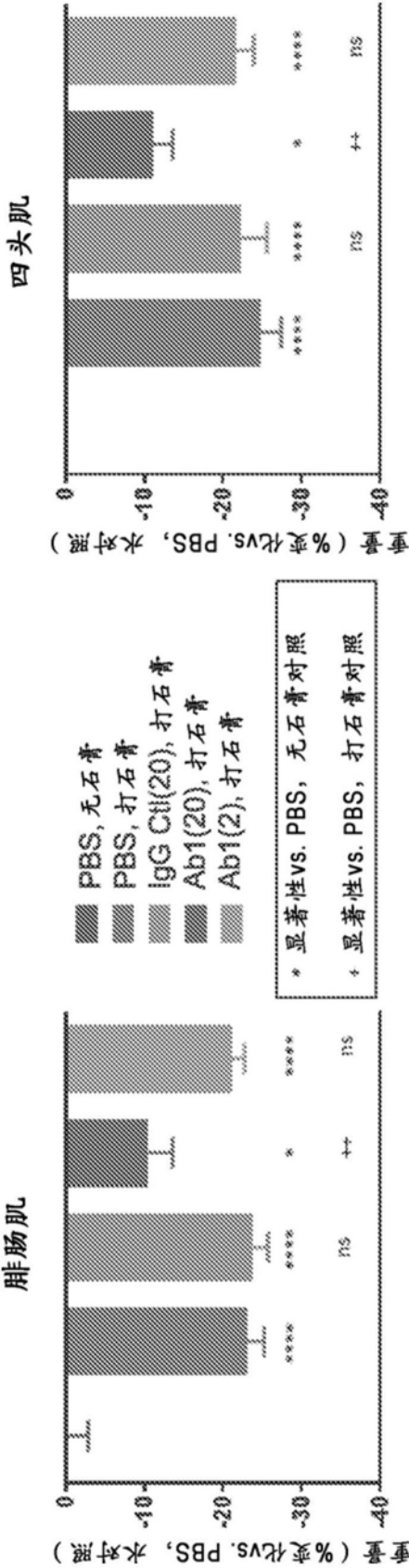


图14C

图14D

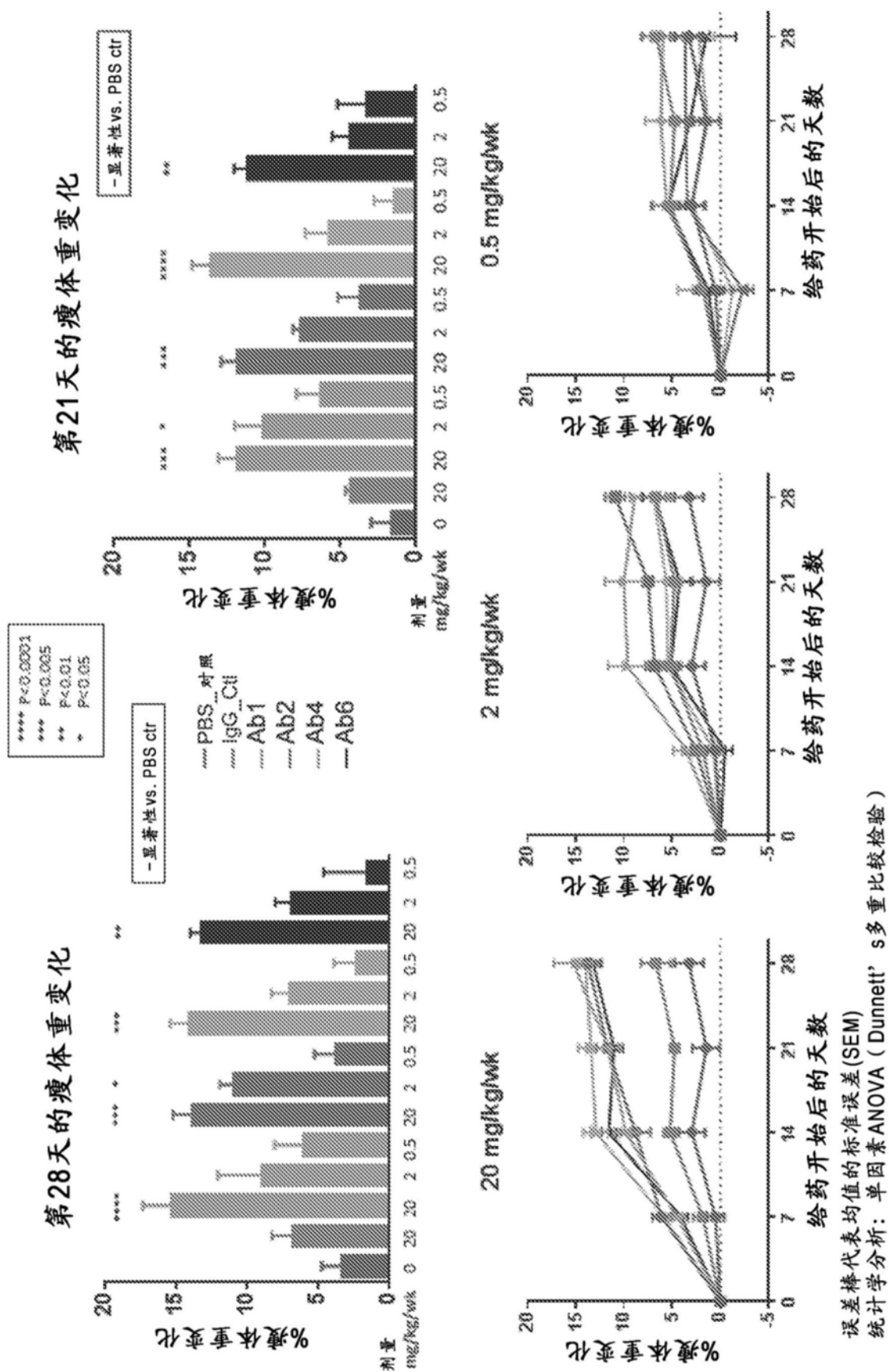


图15

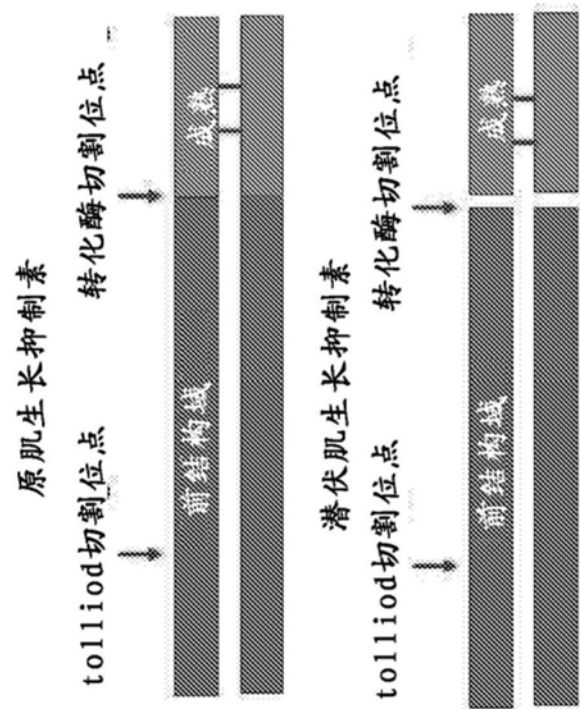


图16A

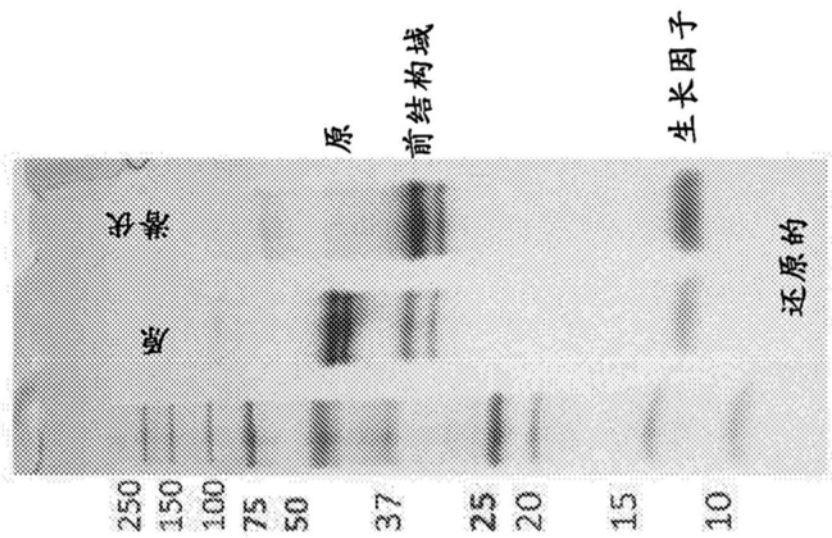


图16B

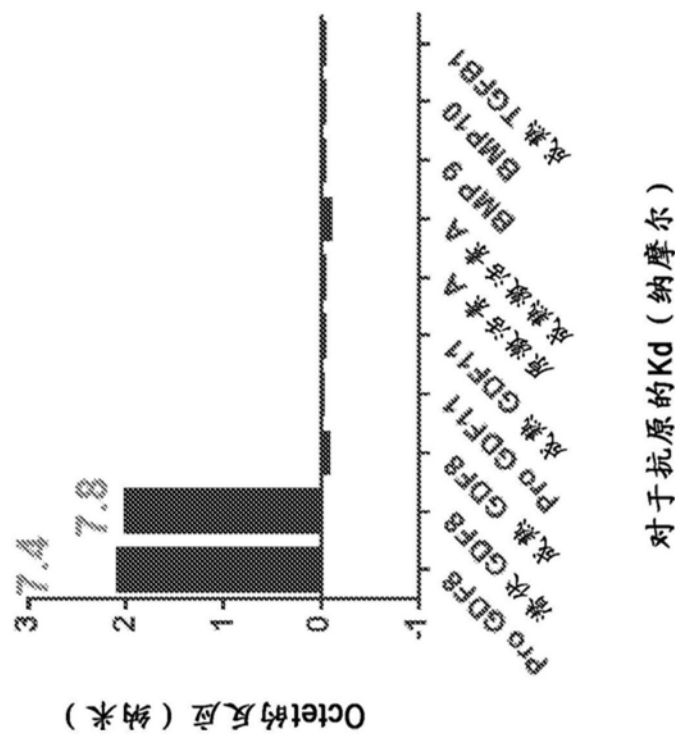


图17A

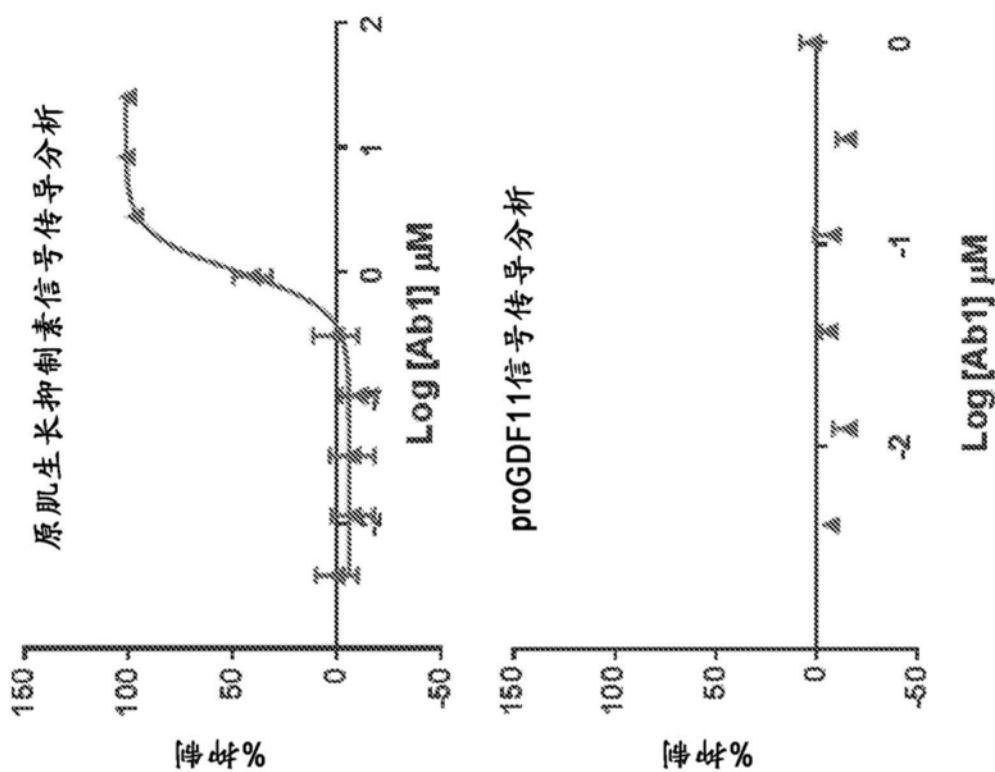


图17B

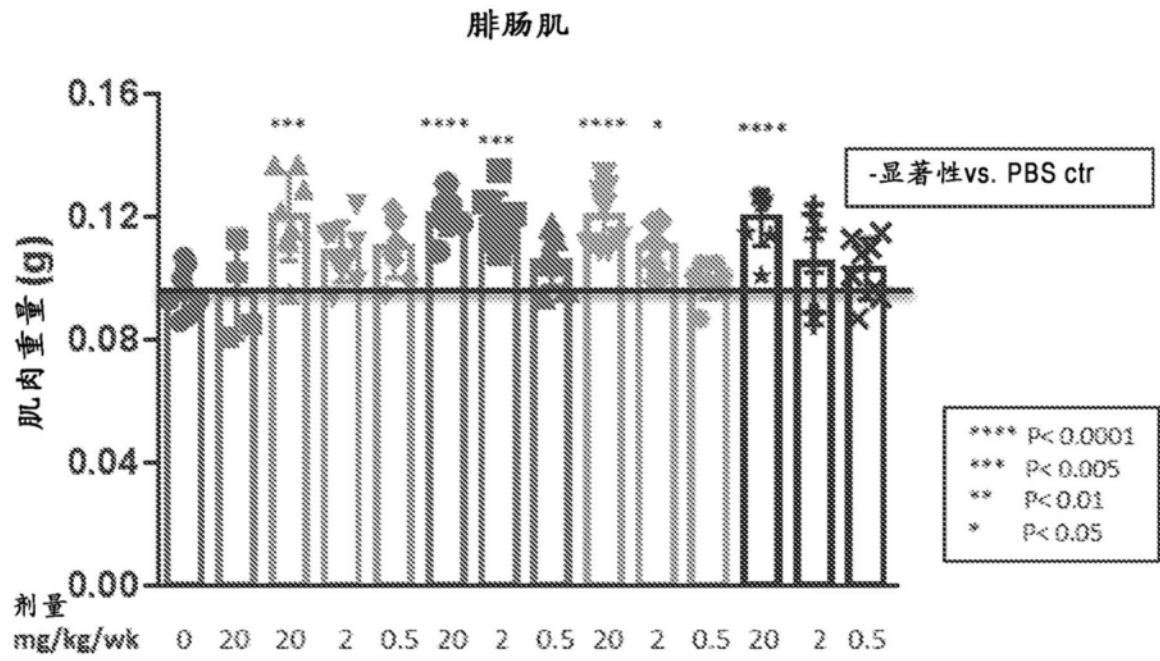


图 18A

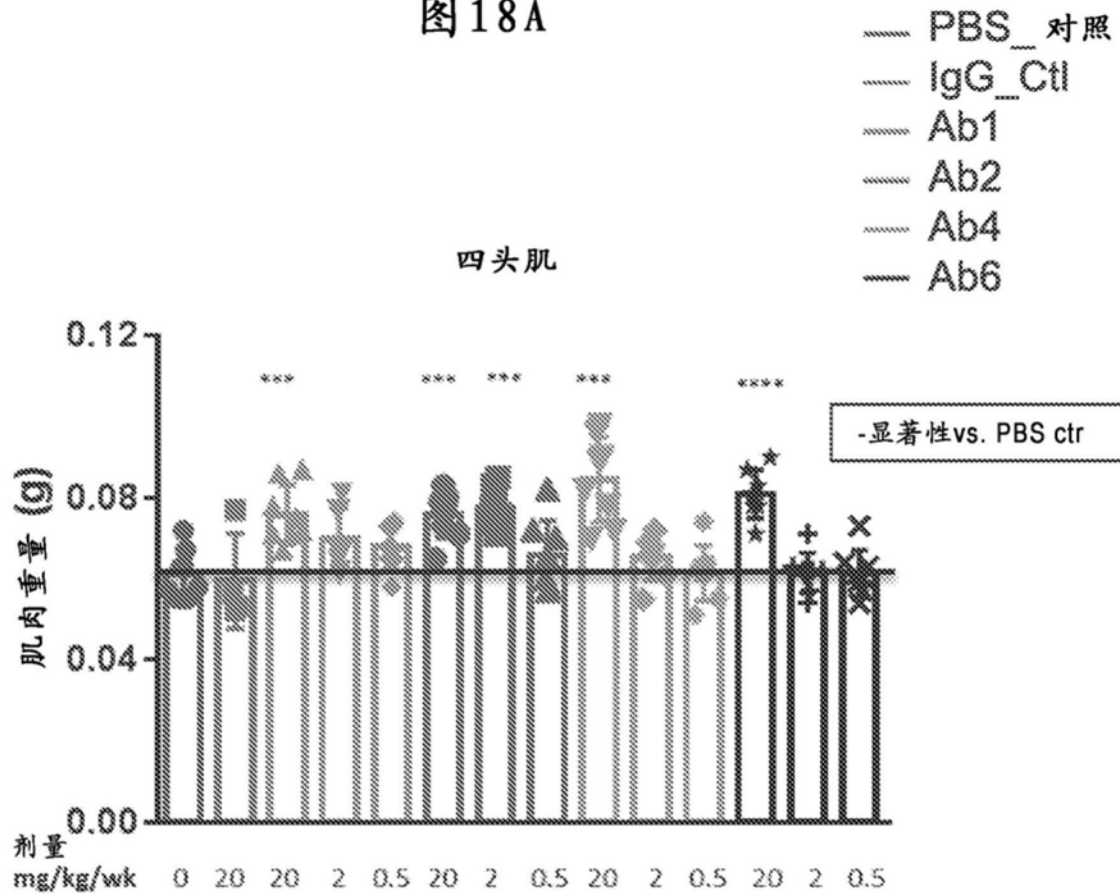


图 18B

肌肉	Ab	PBS_Ctl	20 mg/kg/wk	2 mg/kg/wk	0.5 mg/kg/wk
腓肠肌	Ab1	0	25.1	13.0	14.9
腓肠肌	Ab2	0	25.6	24.0	9.8
腓肠肌	Ab4	0	25.0	15.0	3.1
腓肠肌	Ab6	0	24.8	9.3	7.4
四头肌	Ab1	0	23.9	13.9	10.8
四头肌	Ab2	0	23.9	26.1	7.6
四头肌	Ab4	0	37.8	6.4	0.2
四头肌	Ab6	0	32.0	0.4	0.2

图18C

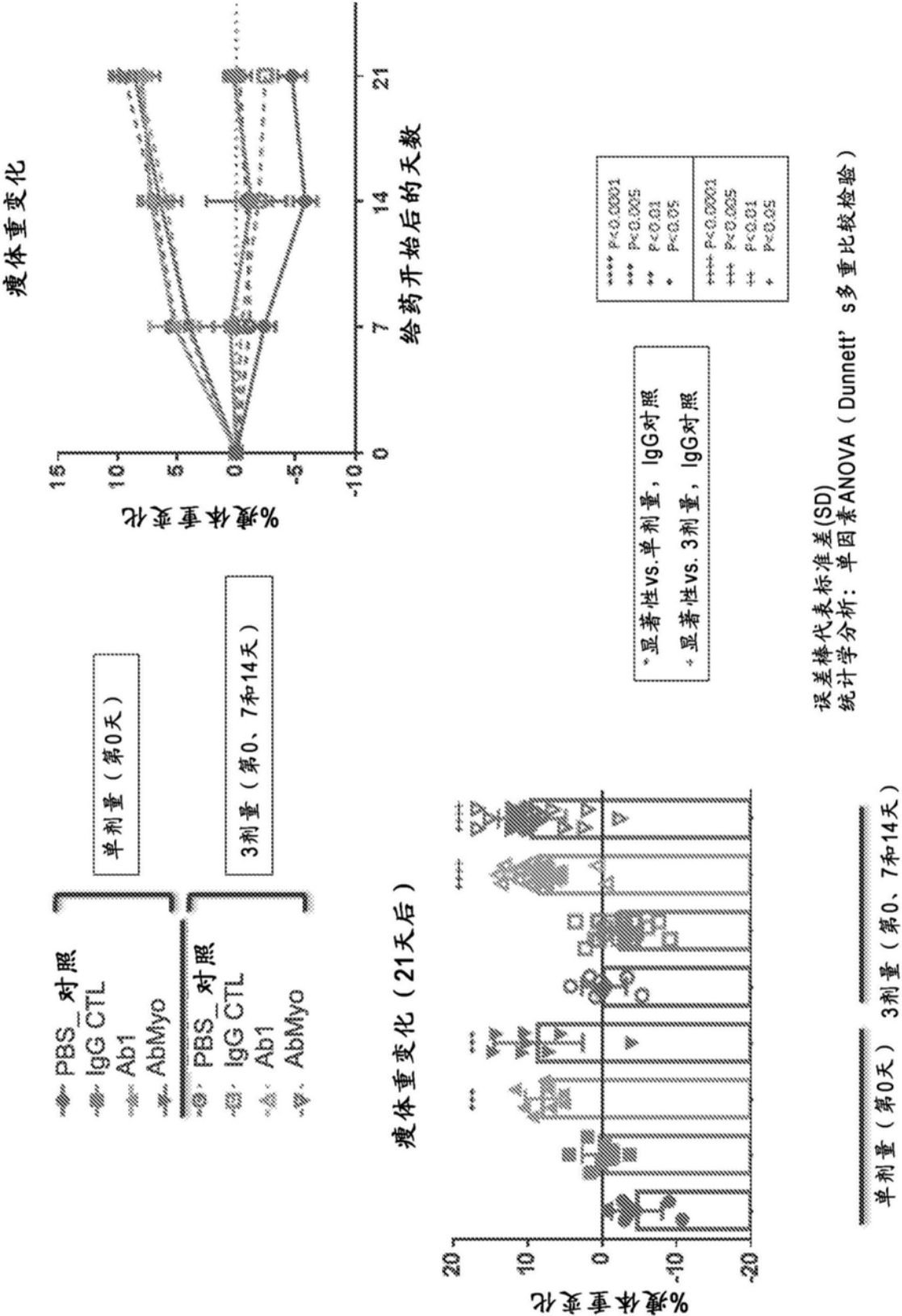


图19

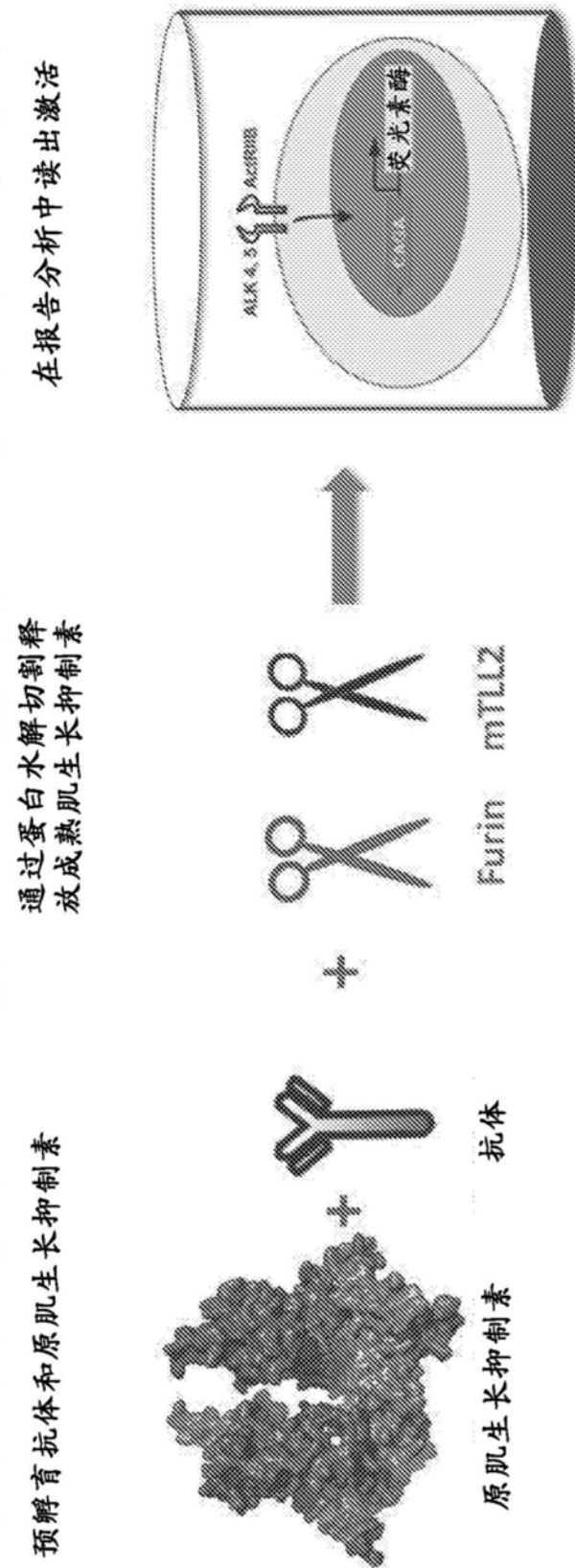


图20

1QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY	60
61ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHY YGM DVWGQGT	120
121TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP	180
181AVLQSSGLYSLSSVFTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEF	240
241LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDFEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	300
301QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS	360
361QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK	420
421SRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLG	452

图21A

1QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRP SGVP	60
61DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL	120
121FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSY	180
181LSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	215

图21B

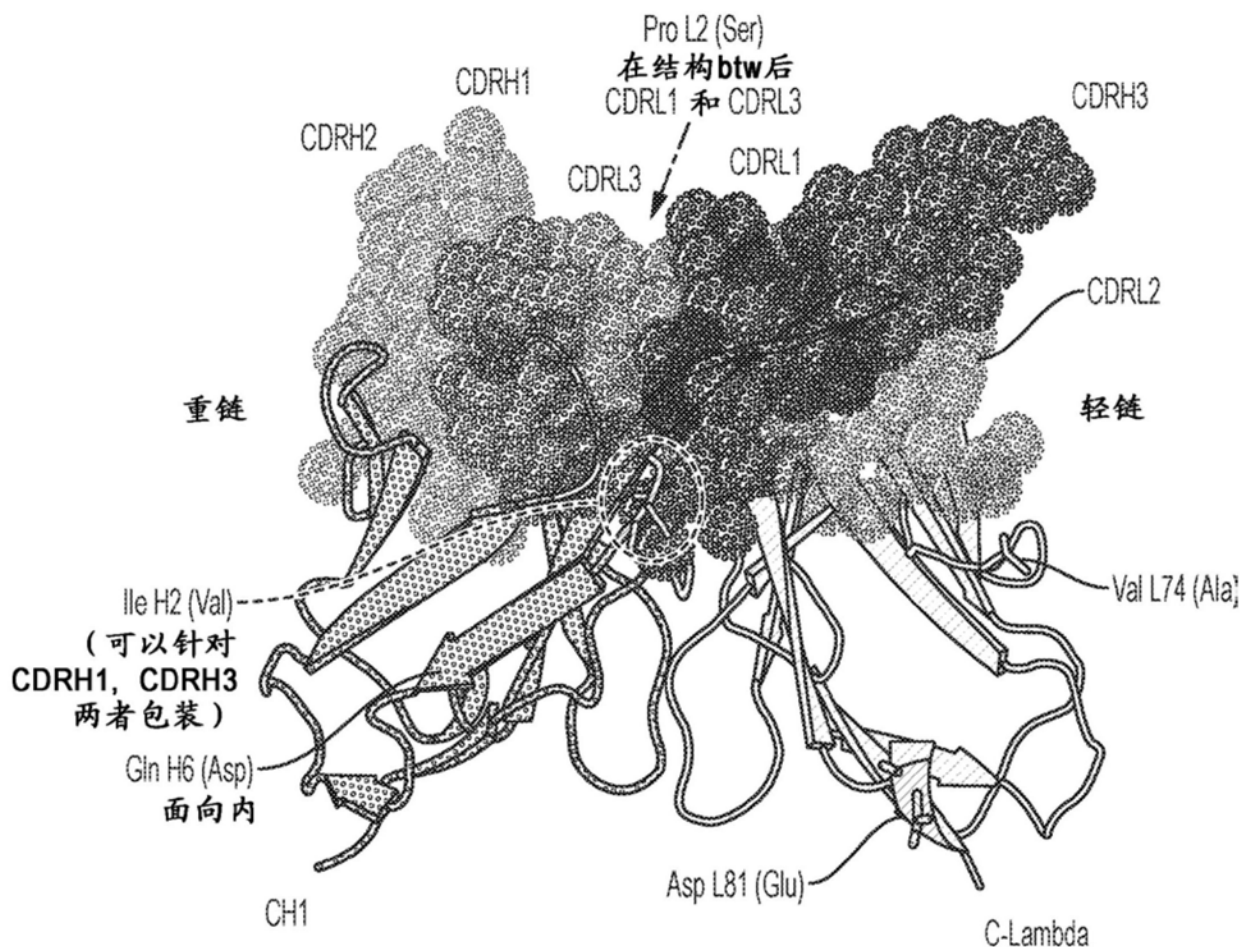


图22

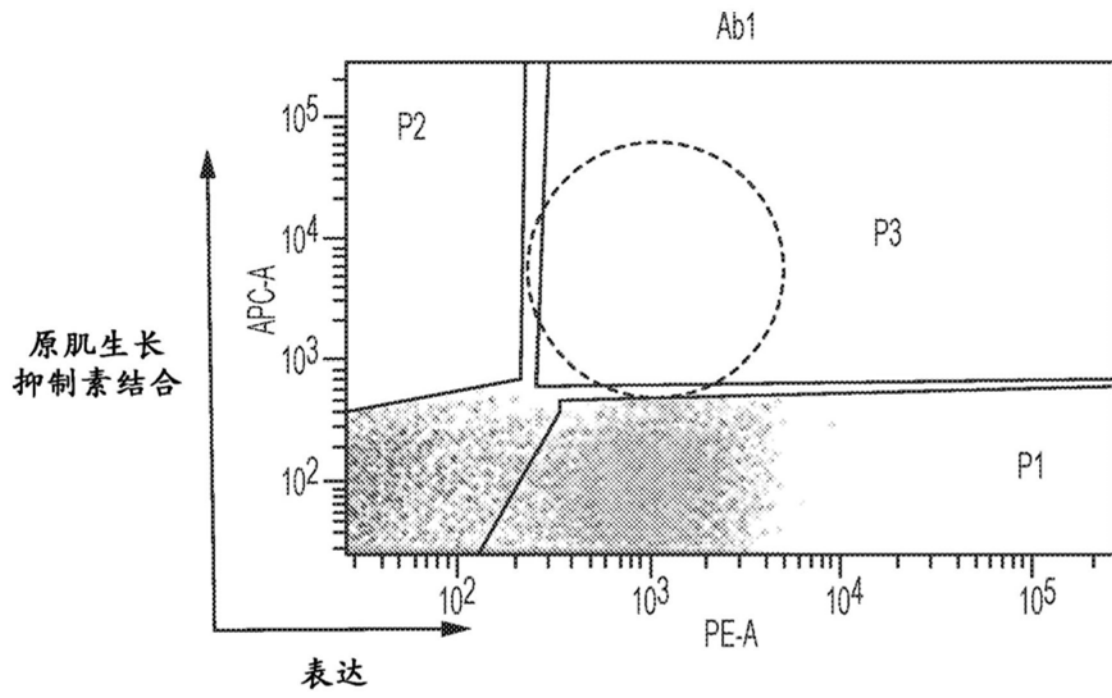


图23A

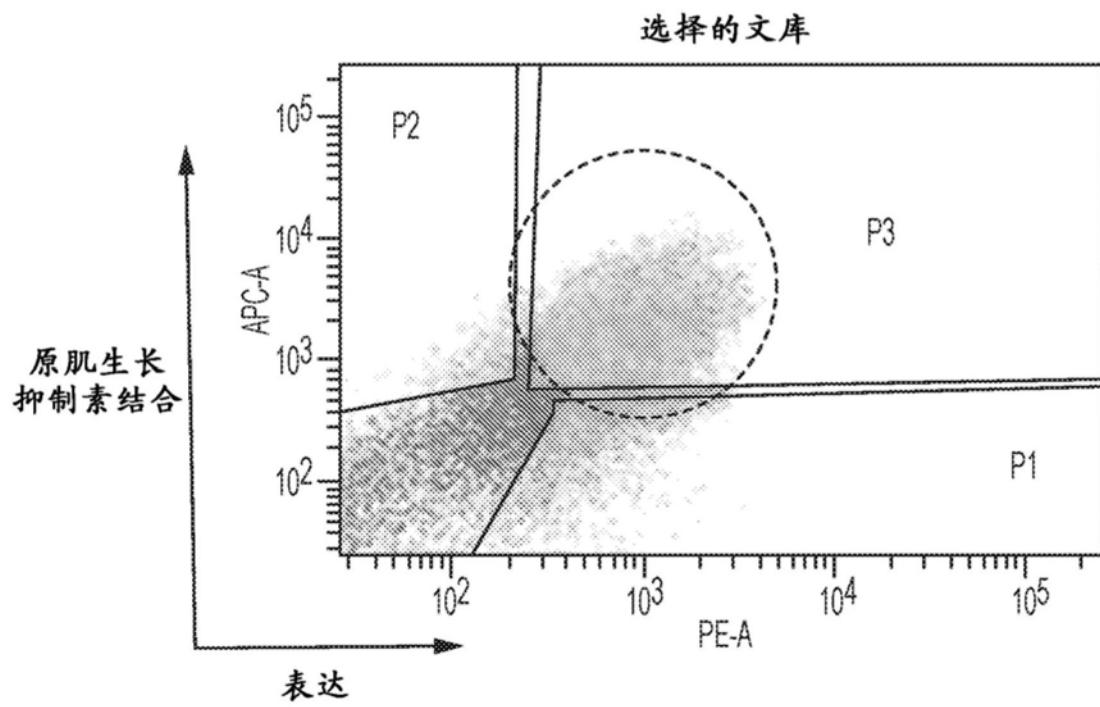
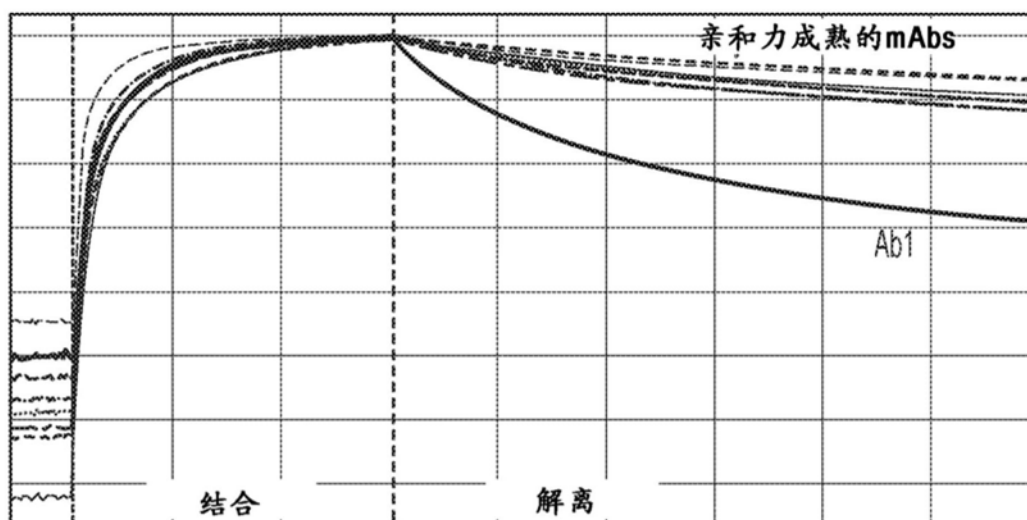


图23B



选择用于进一步表征的前12个克隆

Ab1: 4.8 nM

Ab4: 0.47 nM

10-倍改善的

Ab6: 0.48 nM

10-倍改善的

最佳的亲和力成熟的mAb: <10 pM

>480-倍改善的

图23C

	框架1	CDR1	框架2
Ab1	QIQLVQSGGGVVQ	PGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
Ab3	QIQLVQSGGGVVQ	PGRSLRLSCAASGFAFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
Ab5	QIQLVQSGGGVVQ	PGRSLRLSCAASGFAFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
	CDR2	框架3	
Ab1	VISYDGSN	KYYADSVKGRETISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab3	VISYDGS	IKYYADSVKGRETISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
Ab5	VISYDGN	NKYYADSVKGRETISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
	CDR3	框架4	
Ab1	DLLVRFL	EWSHYYGMDVWGQGT	TVTVSS
Ab3	DLLVRFL	EWSHKYGMDVWGQGT	TVTVSS
Ab5	DLLVRFL	EWSHKYGMDVWGQGT	TVTVSS

图24A

	框架1	CDR1	FRW2
Ab1	QPVLTPPPSASGTPGQRTISCSSGSS	<u>SNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY</u>	
Ab3	QPVLTPPPSASGTPGQRTISCSSGSS	<u>SNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY</u>	
Ab5	QPVLTPPPSASGTPGQRTISCSSGSS	<u>SNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIY</u>	
	CDR2	框架3	
Ab1	<u>SDNQRPSPGVDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC</u>		
Ab3	<u>SDDQRPSPGVDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC</u>		
Ab5	<u>SDDQRPSPGVDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC</u>		
	CDR3	框架4	
Ab1	<u>AAWDDSLNGVFTGGGTKLTVL</u>		
Ab3	<u>AAWDESLNGVFTGGGTKLTVL</u>		
Ab5	<u>AAWDESLNGVFTGGGTKLTVL</u>		

图24B

地塞米松诱导的肌肉萎缩期间的原肌生长抑制素变化

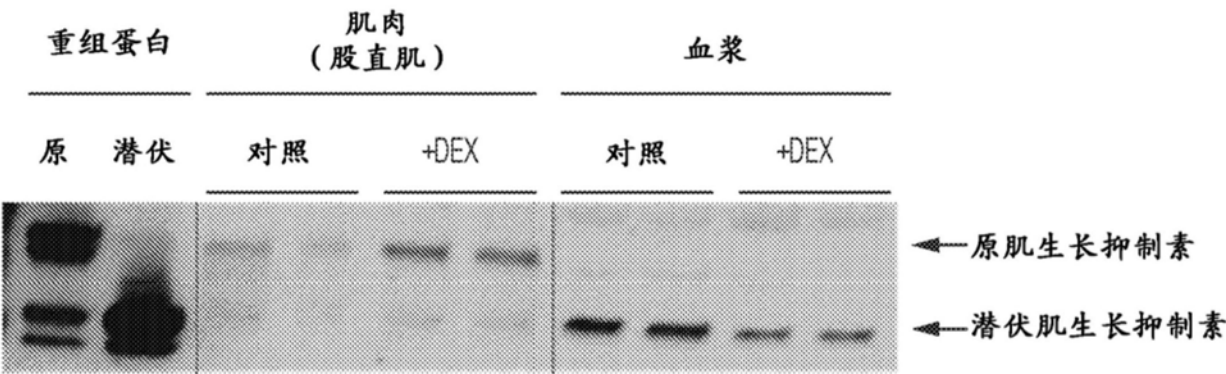


图25

地塞米松诱导的肌肉萎缩期间的原肌生长抑制素变化的量化
 荧光蛋白质印迹(Azure Imager) - 针对每泳道加载的总蛋白标准化

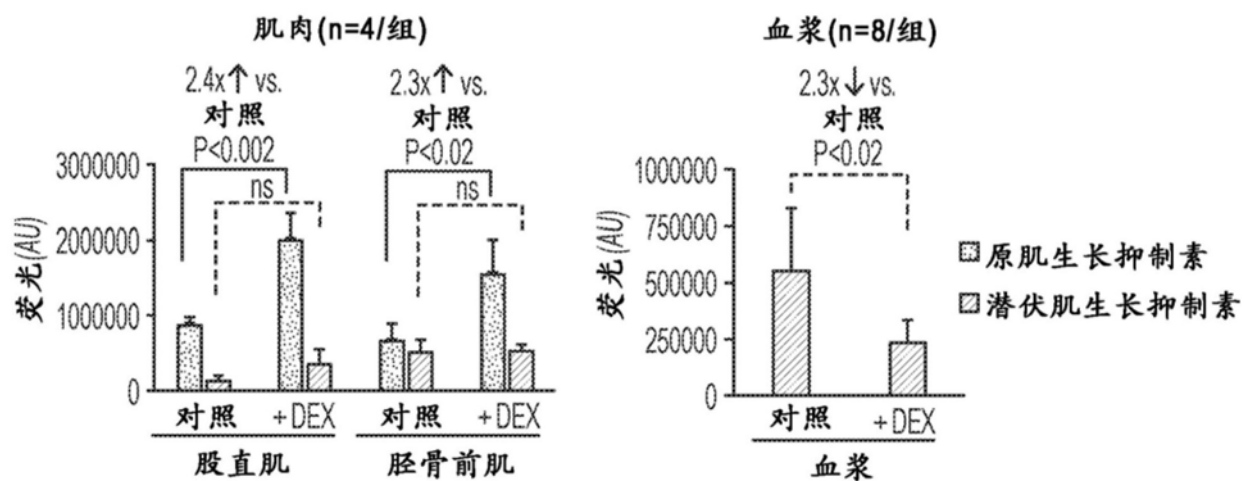


图26

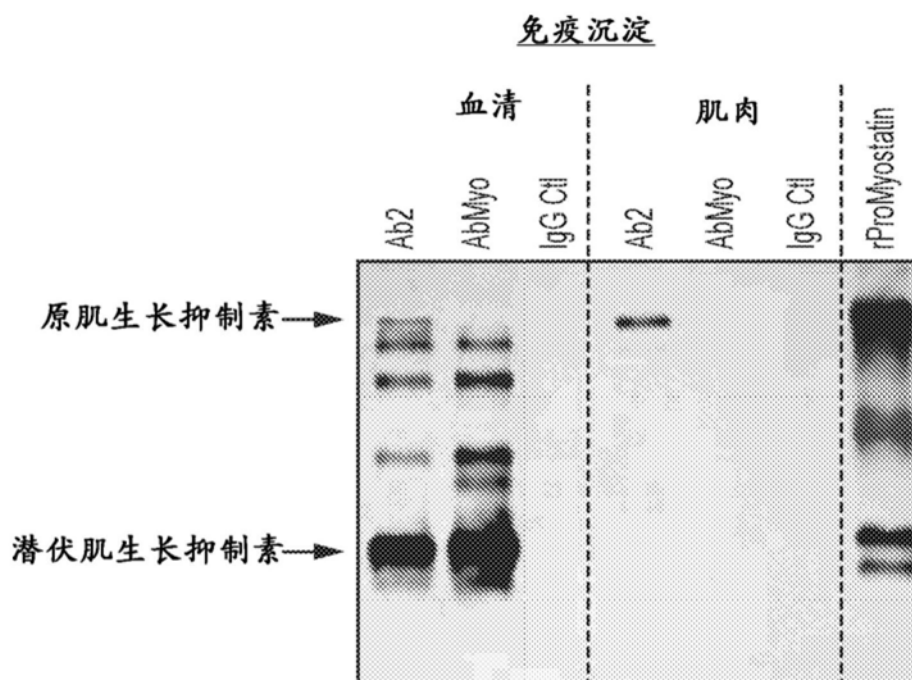


图27

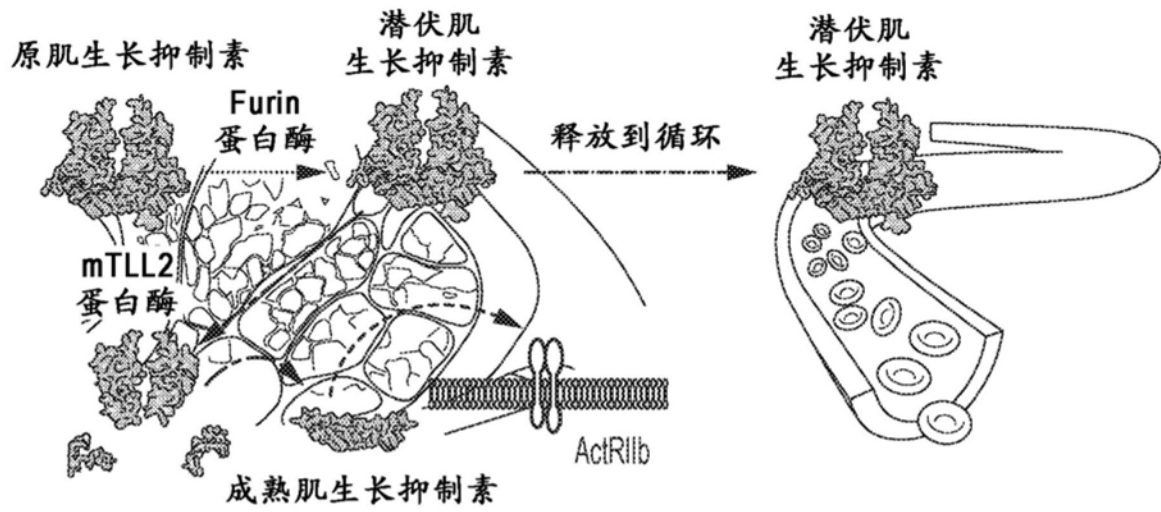


图28A

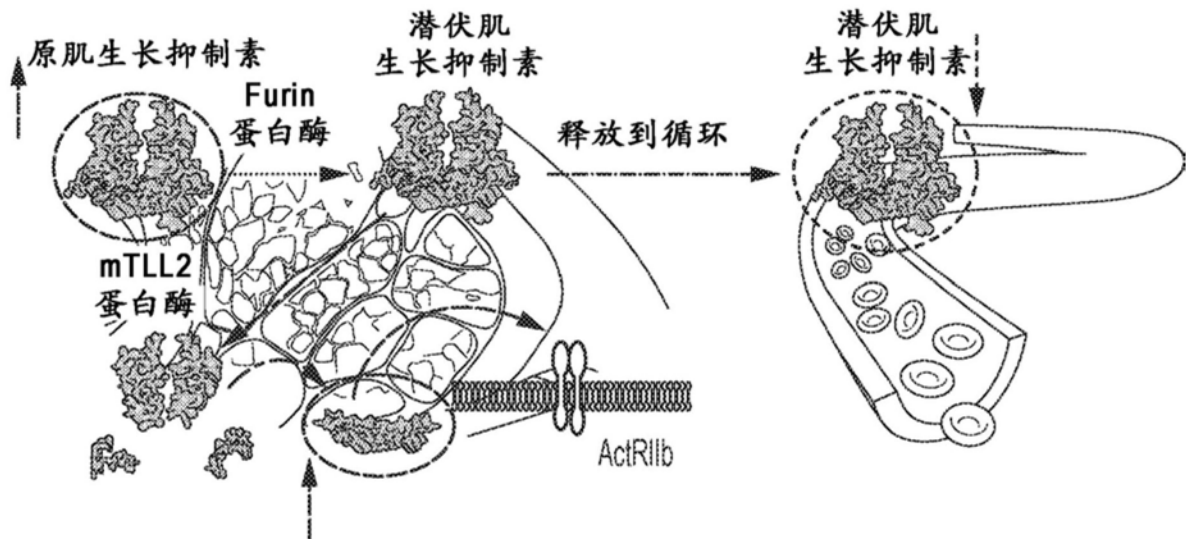


图28B

循环中的总人IgG
大鼠PK研究8336133

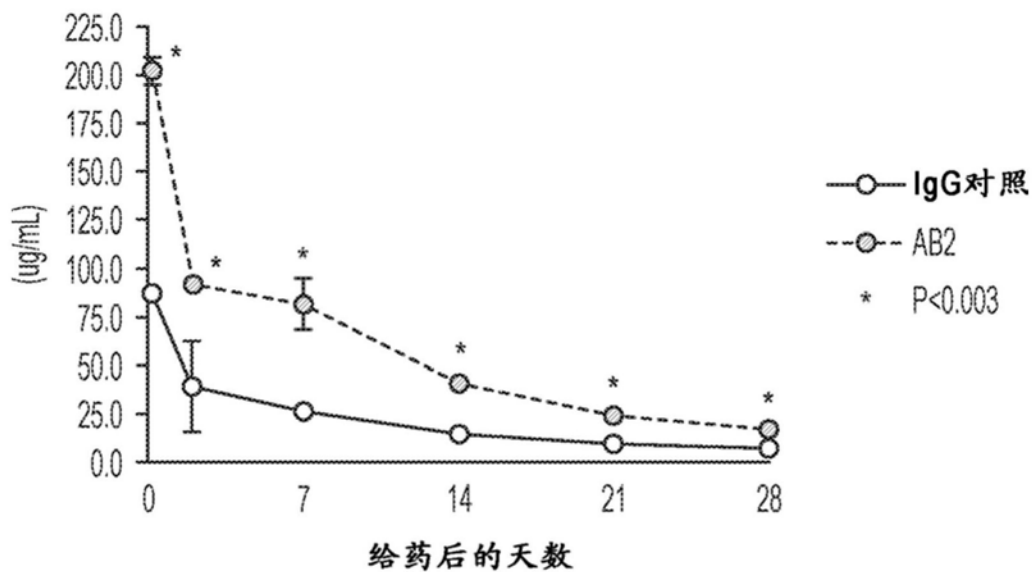


图29

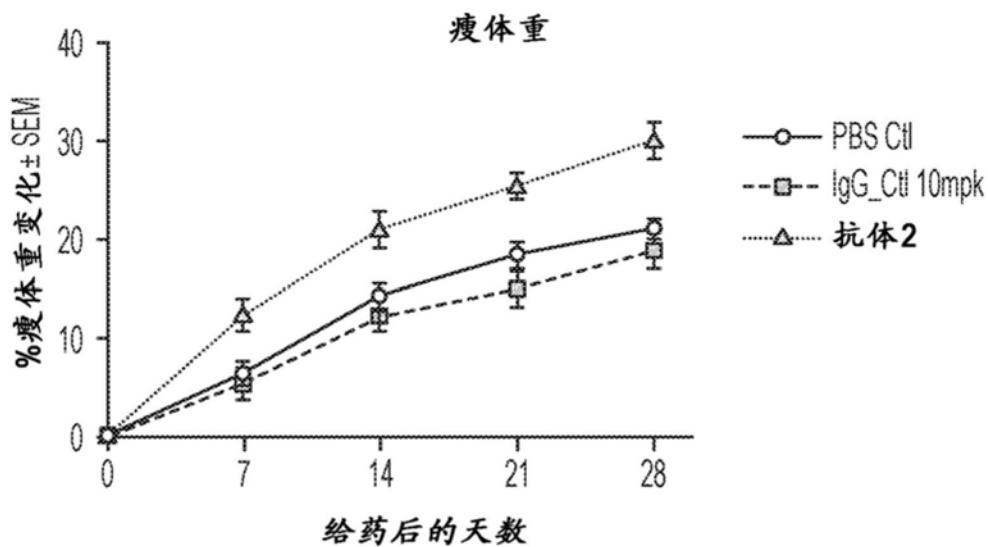


图30A

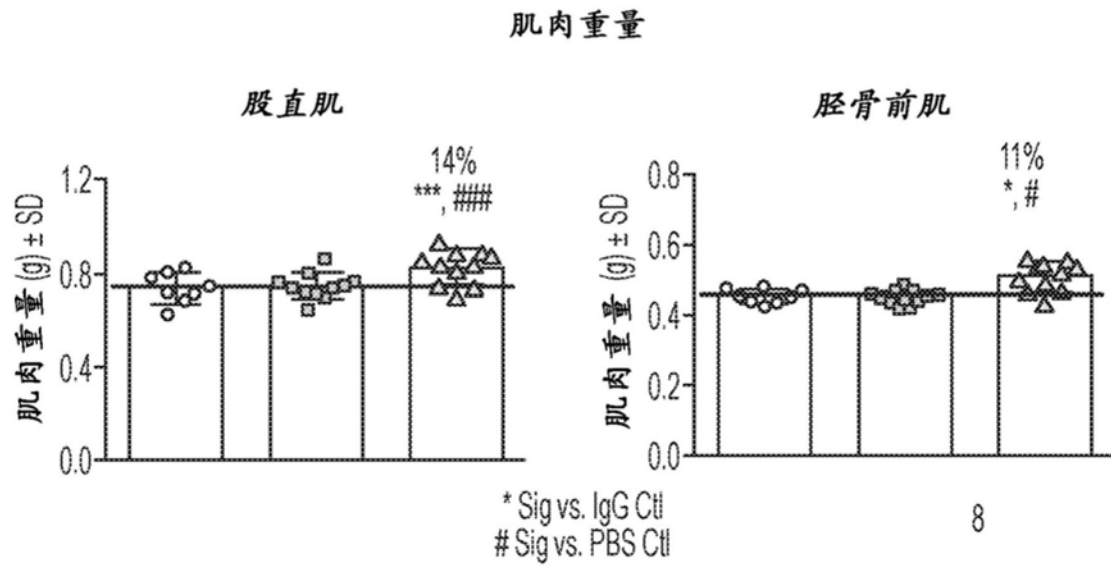


图30B

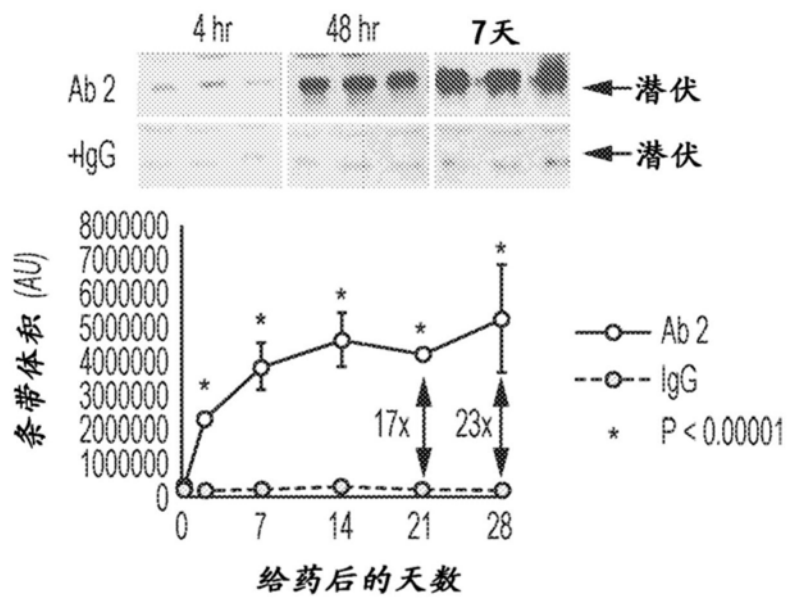


图31A

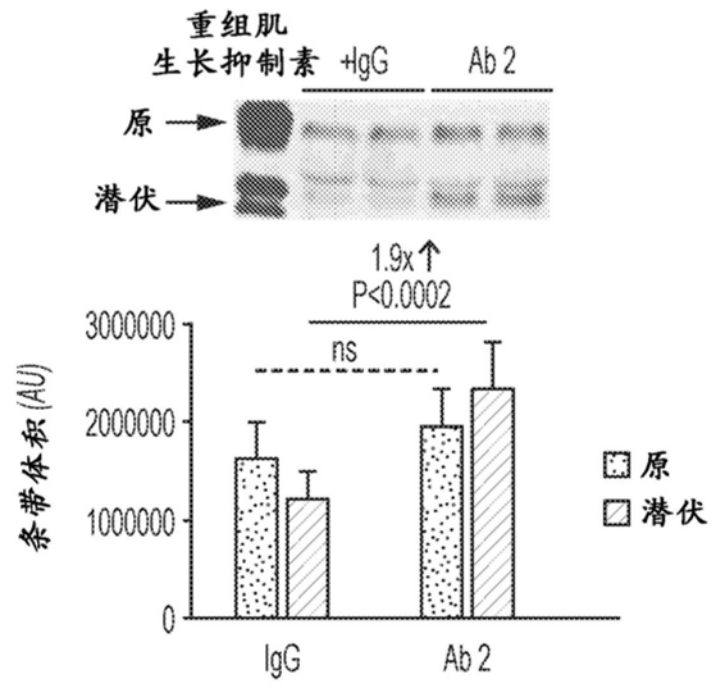


图31B

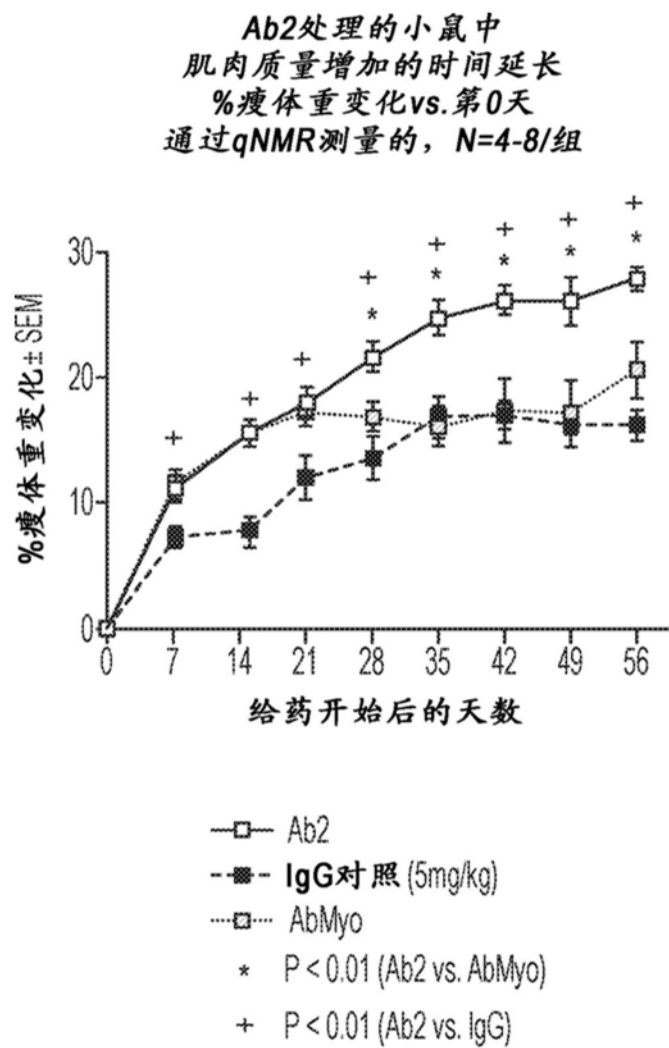
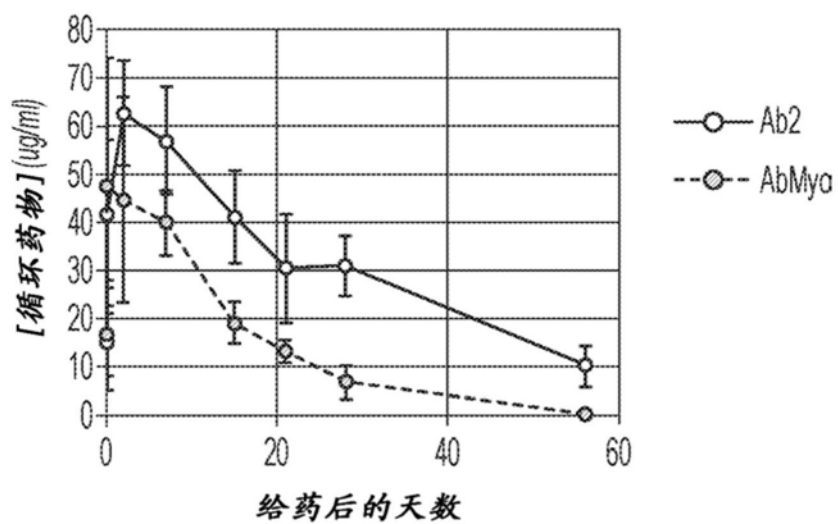


图32

在SCID小鼠中Ab2 vs. AbMyo表现出优良的暴露
 α -人IgG ELISA, N=4/组



	$t_{1/2}$ (天)	AUC _{INF} (天*ug/mL)
AbMyo	8.2	773
Ab2	20.3	2072

图33

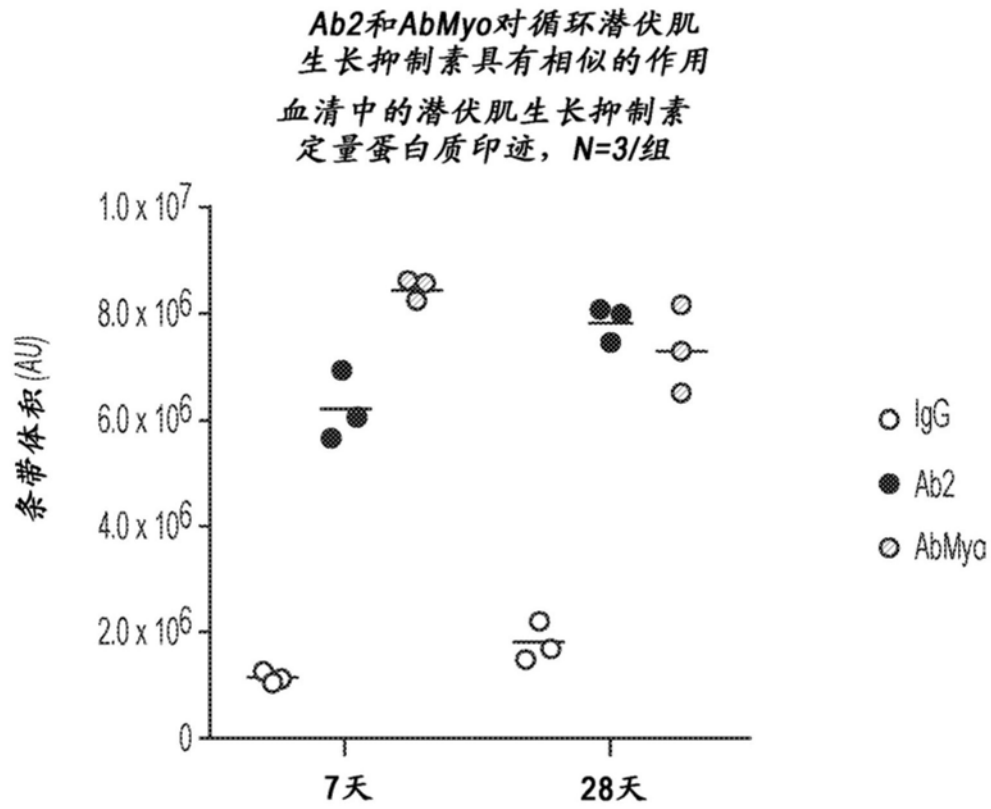


图34

Ab2-和AbMyo-处理的小鼠中的肌肉潜伏肌生长抑制素

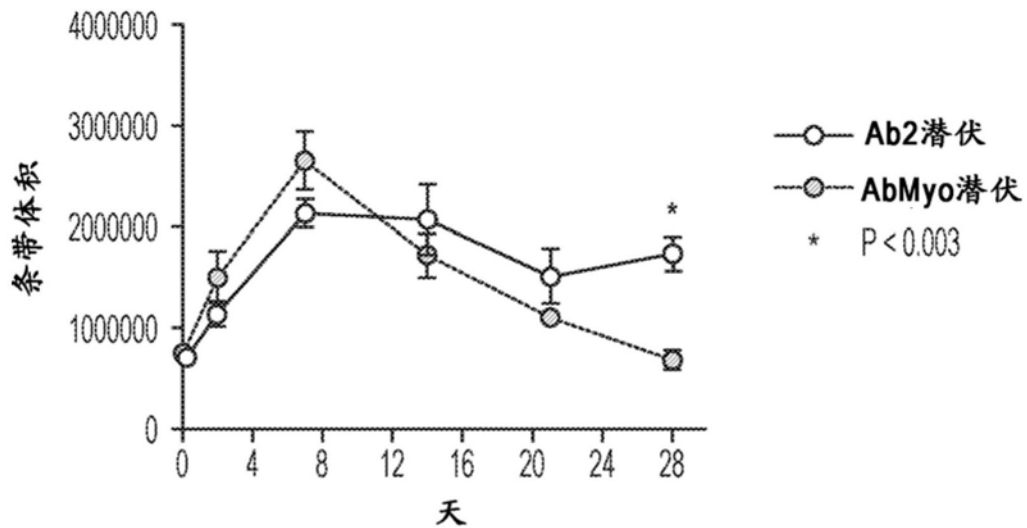


图35A

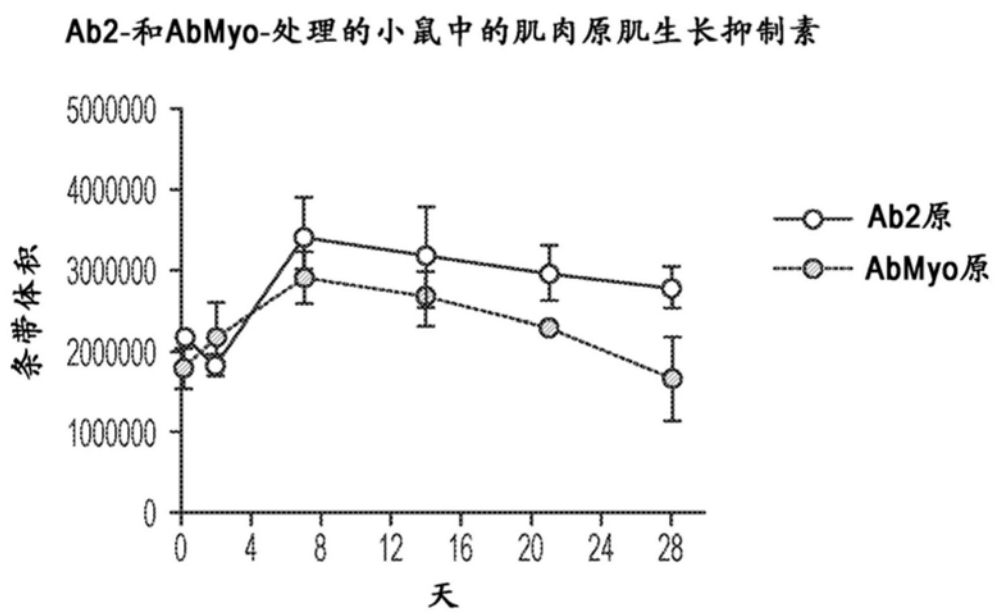


图35B

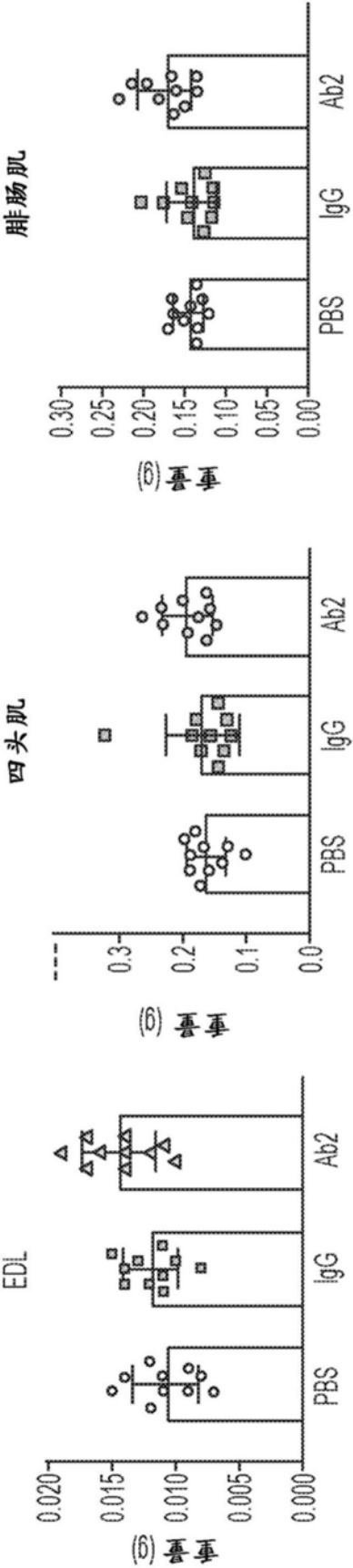


图36A

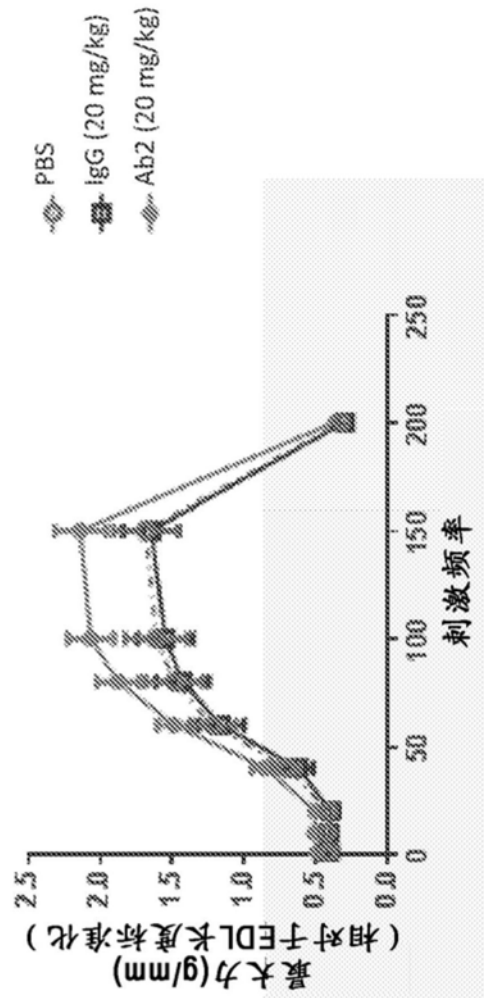


图36B