



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I782836 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110148946

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 02 月 01 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/705 (2006.01)**C07K14/435 (2006.01)**A61K38/17 (2006.01)**A61P21/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61P3/04 (2006.01)**A61P25/00 (2006.01)*

(30)優先權：2007/02/02 美國

60/899,304

2007/05/01 美國

60/927,088

2007/05/25 美國

60/931,880

(71)申請人：美商艾瑟勒朗法瑪公司 (美國) ACCELERON PHARMA INC. (US)

美國

(72)發明人：納夫 約翰 KNOPE, JOHN (US)；希勒 傑斯伯 SEEHRA, JASBIR (US)；庫瑪

瑞賓卓 KUMAR, RAVINDRA (US)

(74)代理人：閻啓泰

(56)參考文獻：

WO 2006/012627A2

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：23 共 127 頁

(54)名稱

衍生自 ActRIIB 的變體與其用途

(57)摘要

在某些方面中，本發明提供調節（促進或抑制）諸如骨、軟骨、肌肉、脂肪及/或神經元組織之組織的生長之組合物及方法。本發明亦提供篩選調節 ActRIIB 蛋白及/或 ActRIIB 配位體之活性之化合物的方法。本文所提供之組合物及方法適用於治療與 ActRIIB 蛋白及/或 ActRIIB 配位體之異常活性相關之疾病。

In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for modulating (promoting or inhibiting) growth of a tissue, such as bone, cartilage, muscle, fat, and/or neuronal tissue. The present invention also provides methods of screening compounds that modulate activity of an ActRIIB protein and/or an ActRIIB ligand. The compositions and methods provided herein are useful in treating diseases associated with abnormal activity of an ActRIIB protein and/or an ActRIIB ligand.

指定代表圖：

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERT****Q****OSGLERCEGEQDKRLHC**
YASWR**N****SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE**
AGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG
PPPPSPLVGLKPLQLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST
PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETMS
RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGD
THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP
FEEEIGQHPSLEELQE VVVHKKMRPTIKDHWLKHFGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG
CVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

圖4



I782836

【發明摘要】

【中文發明名稱】 衍生自ActRIIB的變體與其用途

【英文發明名稱】 VARIANTS DERIVED FROM ACTRIIB AND USES
THEREFOR

【中文】

在某些方面中，本發明提供調節（促進或抑制）諸如骨、軟骨、肌肉、脂肪及/或神經元組織之組織的生長之組合物及方法。本發明亦提供篩選調節ActRIIB蛋白及/或ActRIIB配位體之活性之化合物的方法。本文所提供之組合物及方法適用於治療與ActRIIB蛋白及/或ActRIIB配位體之異常活性相關之疾病。

【英文】

In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for modulating (promoting or inhibiting) growth of a tissue, such as bone, cartilage, muscle, fat, and/or neuronal tissue. The present invention also provides methods of screening compounds that modulate activity of an ActRIIB protein and/or an ActRIIB ligand. The compositions and methods provided herein are useful in treating diseases associated with abnormal activity of an ActRIIB protein and/or an ActRIIB ligand.

【指定代表圖】 圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 衍生自ActRIIB的變體與其用途

【英文發明名稱】 VARIANTS DERIVED FROM ACTRIIB AND USES
THEREFOR

【技術領域】

【0001】 本發明係關於調節組織生長之組合物及方法及篩選調節ActRIIB蛋白及/或ActRIIB配位體之活性之化合物的方法。

【先前技術】

【0002】 轉型生長因子- β (TGF- β) 超家族含有多種共用共同序列元素及結構基元之生長因子。已知此等蛋白質對脊椎動物與無脊椎動物中之多種細胞類型產生生物作用。超家族之成員在胚胎發育期間在圖案形成及組織特化方面執行重要功能且可影響多種分化過程，包括脂肪生成、肌肉生成、軟骨生成、心臟生成、血細胞生成、神經生成及上皮細胞分化。該家族分成兩個一般分支：BMP/GDF與TGF- β /活化素 (activin) /BMP10分支，其成員具有不同的、通常互補之作用。藉由操縱TGF- β 家族之成員的活性，通常有可能引起有機體之顯著生理變化。舉例而言，皮埃蒙特牛 (Piedmontese cattle) 及比利時藍牛 (Belgian Blue cattle) 品種帶有在GDF8 (亦稱為肌肉抑素 (myostatin)) 基因中之功能喪失突變，該突變引起肌肉質量明顯增加。Grobet等人, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4。此外，在人類中，GDF8之非活性等位基因與肌肉質量增加相關，且據報導與異常強度相關。Schuelke等人, N Engl J Med 2004, 350:2682-8。

【0003】 肌肉、骨、軟骨及其他組織的變化可藉由促進或拮抗由適當

TGF- β 家族成員介導之信號轉導來達成。因此，對充當TGF- β 信號轉導之有效調節劑的藥劑存在需要。

【發明內容】

發明概要

【0004】 在某些方面中，本案之揭示提供ActRIIB多肽，尤其ActRIIB變體（包括胺基末端及羧基末端截斷及序列變化）。該等ActRIIB多肽可用於治療多種病症或病狀，尤其肌肉及神經肌肉病症（例如肌肉營養不良、肌肉萎縮性側索硬化（ALS）及肌肉萎縮症）、脂肪組織病症（例如肥胖症）、代謝障礙（例如2型糖尿病）及神經退化性病症。在特定具體實例中，ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）可在與ActRIIB活性相關之任何過程中拮抗ActRIIB受體。視情況，本發明之ActRIIB多肽可經設計以優先拮抗ActRIIB受體之一或多種配位體，諸如GDF8（亦稱為肌肉抑素）、GDF11、活化素A、活化素B、活化素AB、Nodal及BMP7（亦稱為OP-1），且由此可適用於治療其他病症。ActRIIB多肽之實例包括天然產生之ActRIIB多肽以及其功能變體。本案之揭示亦提供一組衍生自ActRIIB之變體，其對活化素具有大大減小之親和力同時保持與GDF11結合。此等變體顯示對肌肉之所需影響而減小對其他組織的影響。

【0005】 在某些方面中，本案之揭示提供包含與諸如GDF8、GDF11、活化素、BMP7或nodal之ActRIIB配位體結合之可溶性ActRIIB多肽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥製劑。視情況，可溶性ActRIIB多肽以小於10微莫耳或小於1微莫耳、100奈莫耳、10奈莫耳或1奈莫耳之Kd與ActRIIB配位體結合。視情況，可溶性ActRIIB多肽抑制ActRIIB信號轉導，諸如由ActRIIB配位體觸發之細胞內信號轉導事件。在該製劑中使用之可溶性ActRIIB多肽可為本文所揭示之彼等多肽中之任一者，諸如具有選自SEQ ID NO: 2、4、6及8-11之胺基酸序列

的多肽，或具有與選自SEQ ID NO: 2、4、6及8-11之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%或99%一致之胺基酸序列的多肽。可溶性ActRIIB多肽可包括天然ActRIIB多肽之功能片段，諸如包含選自SEQ ID NO: 2、4、6及8-11之序列或缺乏C末端1個、2個、3個、4個、5個或10至15個胺基酸之SEQ ID NO: 2之序列的至少10個、20個或30個胺基酸之功能片段。可溶性ActRIIB多肽相對於天然產生之ActRIIB多肽在胺基酸序列中（例如配位體結合域中）可包括一或多處變異。胺基酸序列的變異可（例如）改變當於哺乳動物、昆蟲或其他真核細胞中產生時多肽之糖基化或相對於天然產生之ActRIIB多肽改變多肽之蛋白質裂解。可溶性ActRIIB多肽可為具有ActRIIB多肽（例如ActRIIB或其變體之配位體結合域）作為一個域及一或多個提供所需特性之其他域的融合蛋白，該特性諸如改良之藥物動力學、較容易之純化、對特定組織之靶向等。舉例而言，融合蛋白之域可增強活體內穩定性、活體內半衰期、吸收/投藥、組織定位或分布、蛋白質複合物形成、融合蛋白多聚化及/或純化中之一或多者。可溶性ActRIIB融合蛋白可包括免疫球蛋白Fc域（野生型或突變體）或血清白蛋白。在某些具體實例中，ActRIIB-Fc融合體包含位於Fc域與細胞外ActRIIB域之間的相對未結構化連接子。此未結構化連接子可對應於在ActRIIB之胞外域之C末端處的約15個胺基酸未結構化區（「尾巴」），或其可為介於5個與15個、20個、30個、50個或更多個胺基酸之間，相對無二級結構的人工序列。連接子可富含甘胺酸及脯胺酸殘基且可（例如）含有蘇胺酸/絲胺酸及甘胺酸之重複序列（例如TG₄ (SEQ ID NO:31)或SG₄ (SEQ ID NO:32)重複體）。融合蛋白可包括純化序列，諸如抗原決定基標籤、FLAG標籤、多組胺酸序列及GST融合體。視情況，可溶性ActRIIB多肽包括一或多個選自以下各者之經修飾胺基酸殘基：糖基化胺基酸、PEG化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、經結合生物素之胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸，及與有機衍生劑結合之胺基酸。醫藥製

劑亦可包括一或多種其他化合物，諸如用於治療ActRIIB相關病症之化合物。較佳地，醫藥製劑基本上無熱原質。一般而言，ActRIIB蛋白較佳於合適地介導ActRIIB蛋白之天然糖基化之哺乳動物細胞系中表現以減小患者之不利免疫反應的可能性。已成功使用人類細胞系及CHO細胞系，且預期其他常用哺乳動物表現載體將適用。

【0006】 在某些方面中，本案之揭示提供包含本文所述之醫藥製劑且經標記用於促進人類之組織生長或減小或預防人類之組織流失的封裝藥物。例示性組織包括骨、軟骨、肌肉、脂肪、及神經元組織。

【0007】 在某些方面中，本案之揭示提供包含變異配位體結合（例如GDF8結合）域之可溶性ActRIIB多肽。ActRIIB受體之該等變異配位體結合域包含在人類ActRIIB之胺基酸殘基處之一或多處突變，該等胺基酸殘基諸如E37、E39、R40、K55、R56、Y60、A64、K74、W78、L79、D80、F82及F101。視情況，變異配位體結合域相對於ActRIIB受體之野生型配位體結合域可具有增加之對諸如GDF8/GDF11之配位體之選擇性。為說明起見，本文中證實以下此等突變使變異配位體結合域對GDF11（及由此可推測GDF8）之選擇性增加超過活化素（關於ActRIIB所呈現）：K74Y、K74F、K74I及D80I。以下突變具有相反作用，其使活化素結合之比率增加超過GDF11：D54A、K55A、L79A及F82A。總體（GDF11及活化素）結合活性可藉由包括「尾巴」區或（可推測）未結構化連接子區以及藉由使用K74A突變來增加。引起配位體結合親和力之總體下降的其他突變包括：R40A、E37A、R56A、W78A、D80K、D80R、D80A、D80G、D80F、D80M及D80N。可將突變組合以達成所要作用。舉例而言，影響GDF11:活化素結合之比率的許多突變對配位體結合性具有總體負面影響，且由此可將此等突變與一般增加配位體結合性之突變組合以產生具有配位體選擇性之改良結合蛋白。

【0008】 視情況，變異配位體結合域具有相對於就野生型配位體結合域而言之比率高至少2倍、5倍、10倍或甚至100倍的活化素結合 K_d 與GDF8結合 K_d 之比率。視情況，變異配位體結合域具有相對於野生型配位體結合域高至少2倍、5倍、10倍或甚至100倍的抑制活化素 IC_{50} 與抑制GDF8/GDF11 IC_{50} 之比率。視情況，變異配位體結合域以比抑制活化素之 IC_{50} 小至少2倍、5倍、10倍或甚至100倍之 IC_{50} 抑制GDF8/GDF11。此等可溶性ActRIIB多肽可為包括免疫球蛋白Fc域（野生型或突變體）之融合蛋白。在某些狀況下，主題可溶性ActRIIB多肽為GDF8/GDF11之拮抗劑（抑制劑）。

【0009】 本發明涵蓋ActRIIB之其他變體，諸如以下各者。包含衍生自SEQ ID NO: 4之ActRIIB序列之部分及第二多肽部分的變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸21-29中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸109-134中之任一者終止之序列，且其中該ActRIIB融合蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過活化素、肌肉抑素及/或GDF11的信號轉導。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-29中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸109-133中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-24中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸109-133中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸21-24中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸109-134中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-24中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸118-133中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸21-24中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸118-134中之任一者終止之序

列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-24中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸128-133中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-24中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸128-133中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸21-29中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸118-134中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-29中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸118-133中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸21-29中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸128-134中之任一者終止之序列。上述變體ActRIIB融合蛋白，其中衍生自ActRIIB之部分對應於以SEQ ID NO: 4之胺基酸20-29中之任一者起始且以SEQ ID NO: 4之胺基酸128-133中之任一者終止之序列。申請專利範圍第1項至第12項中任一項之上述變體ActRIIB融合蛋白中之任一者，其中該蛋白為同源二聚體。上述ActRIIB融合蛋白中之任一者，其中該異源部分包含來自IgG重鏈之恆定區。上述ActRIIB融合蛋白中之任一者，其中該異源部分為Fc域。

【0010】 本發明涵蓋其他變體ActRIIB蛋白，諸如以下各者。包含與SEQ ID NO: 4之胺基酸29-109之序列至少80%一致之胺基酸序列的變體ActRIIB蛋白，其中對應於SEQ ID NO: 4之64的位置為R或K，且其中該變體ActRIIB蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過活化素、肌肉抑素及/或GDF11的信號轉導。上述變體ActRIIB蛋白，其中關於SEQ ID NO: 4之序列的至少一處變異係位於配位體結合袋之外。上述變體ActRIIB蛋白，其中關於SEQ ID NO: 4之序列的至少一處變異為位於配位體結合袋內之保守變異。上述變體ActRIIB蛋白，其中關於SEQ

ID NO: 4之序列的至少一處變異為在一或多個選自由K74、R40、Q53、K55、F82及L79組成之群之位置處的變異。上述變體ActRIIB蛋白，其中該蛋白在不同於ActRIIB之內源N-X-S/T序列的位置處及在配位體結合袋之外之位置處包含至少一個N-X-S/T序列。

【0011】 本發明涵蓋其他變體ActRIIB蛋白，諸如以下各者。包含與SEQ ID NO: 4之胺基酸29-109之序列至少80%一致之胺基酸序列的ActRIIB蛋白，且其中該蛋白在不同於ActRIIB之內源N-X-S/T序列的位置處及在配位體結合袋之外之位置處包含至少一個N-X-S/T序列。上述變體ActRIIB蛋白，其中該蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置24的位置處包含N且在對應於SEQ ID NO: 4之位置26的位置處包含S或T，且其中該變體ActRIIB蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過活化素、肌肉抑素及/或GDF11的信號轉導。上述變體ActRIIB蛋白，其中該蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置64的位置處包含R或K。上述變體ActRIIB蛋白，其中關於SEQ ID NO: 4之序列的至少一處變異為位於配位體結合袋內之保守變異。上述變體ActRIIB蛋白，其中關於SEQ ID NO: 4之序列的至少一處變異為在一或多個選自由K74、R40、Q53、K55、F82及L79組成之群之位置處的變異。上述變體ActRIIB蛋白，其中該蛋白為進一步包含異源部分之融合蛋白。上述變體ActRIIB融合蛋白中之任一者，其中該蛋白為同源二聚體。上述ActRIIB融合蛋白之變體中之任一者，其中異源部分包含來自IgG重鏈之恆定區，諸如Fc域。

【0012】 在某些方面中，本案之揭示提供編碼可溶性ActRIIB多肽之核酸，其不編碼完整ActRIIB多肽。經分離聚核苷酸可包含可溶性ActRIIB多肽（諸如上述）之編碼序列。舉例而言，經分離核酸可包括編碼ActRIIB之胞外域（例如配位體結合域）之序列及會編碼ActRIIB之部分或全部跨膜域及/或細胞質域，但編碼位於跨膜域或細胞質域內或位於胞外域與跨膜域或細胞質域之

間的終止密碼子之序列。舉例而言，經分離聚核苷酸可包含全長ActRIIB聚核苷酸序列（諸如SEQ ID NO: 8）或部分截斷型式，該經分離聚核苷酸進一步包含轉錄終止密碼子，其處於3'末端之前至少六百個核苷酸處或以其他方式定位使得聚核苷酸之轉譯產生視情況與全長ActRIIB之截斷部分融合之胞外域。本文所揭示之核酸可與表現啟動子以可操作方式連接，且本案之揭示提供經該等重組性聚核苷酸轉型之細胞。較佳地，細胞為哺乳動物細胞，諸如CHO細胞。

【0013】 在某些方面中，本案之揭示提供製造可溶性ActRIIB多肽之方法。該方法可包括在諸如中國倉鼠卵巢（CHO）細胞之合適細胞中表現本文所揭示之核酸中之任一者（例如SEQ ID NO: 6）。該方法可包含：a）在適合於表現可溶性ActRIIB多肽之條件下培養細胞，其中該細胞經可溶性ActRIIB表現構築體轉型；及b）回收如此表現之可溶性ActRIIB多肽。可使用自細胞培養物獲得蛋白質之熟知技術中之任一者以粗製、經部分純化或經高度純化之部分的形式回收可溶性ActRIIB多肽。

【0014】 在某些方面中，本文所揭示之可溶性ActRIIB多肽可在用於治療患有與肌肉流失或不足肌肉生長相關之病症之個體的方法中使用。該等病症包括肌肉萎縮症、肌肉營養不良、肌肉萎縮性側索硬化（ALS）及肌肉消瘦病症（例如惡病質、厭食、DMD症候群、BMD症候群、AIDS消瘦症候群、肌肉營養不良、神經肌肉疾病、運動神經元疾病、神經肌肉銜接點疾病及發炎性肌病）。方法可包含將有效量之可溶性ActRIIB多肽投予有需要之個體。

【0015】 在某些方面中，本文所揭示之可溶性ActRIIB多肽可在用於減少體脂肪含量或降低體脂肪含量增加之速率及用於治療與不合需要之體重增加相關之病症的方法中使用，該病症諸如肥胖症、非胰島素依賴性糖尿病（NIDDM）、心血管疾病、癌症、高血壓、骨關節炎、中風、呼吸問題、及膽囊疾病。此等方法可包含將有效量之可溶性ActRIIB多肽投予有需要之個體。

【0016】 在某些特定方面中，本文所揭示之可溶性ActRIIB多肽可在用於治療與GDF8之異常活性相關之病症的方法中使用。該等病症包括代謝障礙，諸如2型糖尿病、葡萄糖耐受性損傷、代謝症候群（例如X症候群）及由外傷（例如燒傷或氮失衡）誘發之胰島素抗性；脂肪組織病症（例如肥胖症）；肌肉營養不良（包括杜興氏肌肉營養不良（Duchenne muscular dystrophy））；肌肉萎縮性側索硬化（ALS）；肌肉萎縮症；器官萎縮症；虛弱；腕隧道症候群；充血性阻塞性肺病；肌肉減少症、惡病質及其他肌肉消瘦症候群；骨質疏鬆症；糖皮質激素誘發之骨質疏鬆症；骨質減少；骨關節炎；骨質疏鬆症相關骨折；歸因於慢性糖皮質激素療法、過早性腺衰竭、雄激素抑制、維生素D缺乏、繼發性副甲狀腺高能症、營養不足、及神經性厭食之低骨質量。該方法可包含將有效量之可溶性ActRIIB多肽投予有需要之個體。

【0017】 在某些方面中，本案之揭示提供用於鑑別刺激諸如骨、軟骨、肌肉及脂肪之組織生長之藥劑的方法。該方法包含：a) 鑑別與可溶性ActRIIB多肽競爭性地結合ActRIIB多肽之配位體結合域之測試藥劑；及b) 評估該藥劑對組織生長的影響。

【0018】 在某些方面中，本案之揭示提供用於拮抗細胞中ActRIIB多肽或ActRIIB配位體（例如GDF8、GDF11、活化素、BMP7及Nodal）之活性的方法。該等方法包含使該細胞與可溶性ActRIIB多肽接觸。視情況，透過ActRIIB/ActRIIB配位體複合物介導之信號轉導，例如藉由監測細胞增殖，來監測ActRIIB多肽或ActRIIB配位體之活性。該等方法之細胞包括造骨細胞、軟骨細胞、肌細胞、脂肪細胞及肌肉細胞。

【0019】 在某些方面中，本案之揭示提供可溶性ActRIIB多肽製造用於治療如本文所述之病症或病狀之醫藥品的用途。

【圖式簡單說明】**【0020】**

[圖1]展示人類ActRIIA可溶性（細胞外）多肽序列（SEQ ID NO: 1，116 aa）。C末端「尾巴」加下劃線。

[圖2]展示人類ActRIIB可溶性（細胞外）多肽序列（SEQ ID NO: 2，116 aa）。C末端「尾巴」加下劃線。

[圖3]展示人類ActRIIA前驅蛋白序列（SEQ ID NO: 3，NP_001607，513 aa）。信號肽加下劃線；胞外域為粗體（亦稱作SEQ ID NO: 1）；且潛在N-連接糖基化位點加框。

[圖4]展示人類ActRIIB前驅蛋白序列（SEQ ID NO: 4，NM_001106，512 aa）。信號肽加下劃線；胞外域為粗體（亦稱作SEQ ID NO: 2）；且潛在N-連接糖基化位點加框。

[圖5]展示編碼人類ActRIIA可溶性（細胞外）多肽之核酸序列，設計成SEQ ID NO: 5 (348 bp)。

[圖6]展示編碼人類ActRIIB可溶性（細胞外）多肽之核酸序列，設計成SEQ ID NO: 6 (348 bp)。

[圖7]展示編碼人類ActRIIA前驅蛋白之核酸序列，設計成SEQ ID NO: 7 (NM_001616之核苷酸164-1705，1542 bp)。

[圖8]展示編碼人類ActRIIB前驅蛋白之核酸序列，設計成SEQ ID NO: 8 (NM_001106之核苷酸5-1543，1539 bp)。

[圖9]展示ActRIIA或ActRIIB之胞外（可溶性）域之表現。表現ActRIIA或ActRIIB之人類胞外域之構築體經製造具有全部三個信號序列。

[圖10]展示三種具有不同信號序列SEQ ID NO: 9-11之可溶性人類ActRIIB多肽。

[圖11]展示一種具有原生信號序列SEQ ID NO: 12之可溶性人類ActRIIA多肽。

[圖12]展示ActRIIA或ActRIIB多肽之Fc融合體之設計。展示可撓性連接子序列及Fc序列（SEQ ID NO: 13）。可在Fc序列之一個以上胺基酸殘基處進行突變。用於突變之該等殘基之實例加下劃線，且稱作Asp-265、離胺酸-322及Asn-434。

[圖13]展示ActRIIB多肽之配位體結合袋內的活化素-ActRIIB相互作用。配位體結合袋中之胺基酸殘基之實例示為E39、K55、Y60、K74、W78、D80及F101。本發明之ActRIIB多肽可包含在此等胺基酸殘基中之一或多者處的突變。

[圖14]展示人類ActRIIA (SEQ ID NO: 17)與ActRIIB (SEQ ID NO: 18)之胞外域的排比，其中在ActRIIB中之突變位置於本文中證實影響配位體結合。該排比顯示此等突變之位置在ActRIIA中保守。

[圖15]展示A-204報導體基因檢定之圖解。該圖展示報導體載體：pGL3(CAGA)12 (以SEQ ID NO: 15揭示之(CAGA)12)（描述於Dennler等人，1998, EMBO 17: 3091-3100中）。CAGA12基元(SEQ ID NO: 15)存在於TGF- β 反應基因（PAI-1基因）中，故此載體一般用於經Smad2及3進行因子的信號轉導。圖15揭示之"(AGCCAGACA)12"為SEQ ID NO: 19。

[圖16]展示ActRIIB-Fc中之多種突變對GDF-11 A-204報導體基因檢定的影響。A64構築體，ActRIIB(A64 20-119)-Fc，對GDF-11活性顯示最小影響。R64形式，ActRIIB(R64 20-119)-Fc，引起A204細胞中GDF-11抑制的實質性增加；且R64形式與添加胞外域之15個C末端胺基酸之組合，ActRIIB(R64 20-134)，產生甚至更有效之GDF-11活性抑制劑。

[圖17]展示ActRIIB-Fc中之多種突變對活化素A的影響，A-204報導體基因

檢定。A64構築體對活化素A活性顯示最小影響。K74A突變引起A204 RGA中之活化素A抑制的實質性增加。缺乏活化素A之對照樣本顯示無活性。

[圖18]展示PBS（白色條）、鼠類ActRIIB（WT+15尾巴）1 mg/kg（淺灰色條）、鼠類ActRIIB（WT+15尾巴）3 mg/kg（深灰色條）及鼠類ActRIIB（WT+15尾巴）10 mg/kg（黑色條）肌肉營養不良（*mdx*）小鼠之握緊強度量測。鼠類ActRIIB（WT+15尾巴）1及3 mg/kg組之握緊強度量測趨向於顯著性。10 mg/kg組之強度量測顯著高於經PBS治療之小鼠的彼強度量測，* $P < 0.05$ ，雙尾學生t測試。

[圖19]展示經PBS及鼠類ActRIIB（K74A+15尾巴）治療之SOD雌性小鼠的平均握緊強度量測（分別為白色條及黑色條）。該圖說明在疾病之早期（第117天）與稍晚期（第149天）中與PBS組相比鼠類ActRIIB（K74A+15尾巴）組之強度增加。* $P < 0.05$ ，雙尾學生t測試。

[圖20]展示經PBS及鼠類ActRIIB（K74A+15尾巴）治療之SOD小鼠的卡本-麥爾存活曲線比較（Kaplan-Meier survival curve comparison）（分別為白色線及黑色線）。經鼠類ActRIIB（K74A+15尾巴）治療之組與PBS組相比較平均存活天數增加。

[圖21]展示經PBS及人類ActRIIB(R64 20-134)-Fc HFD餵食之小鼠的基線體組成變化百分率（分別為白色條及黑色條）。用人類ActRIIB(R64 20-134)-Fc蛋白治療顯著減少脂肪質量且增加瘦肉組織。

[圖22]展示人類ActRIIA (SEQ ID NO: 20)與ActRIIB (SEQ ID NO: 21)之排比，其中於本文中基於多個ActRIIB及ActRIIA晶體結構之複合分析所推斷之殘基直接接觸以框表示之配位體（配位體結合袋）。

[圖23]展示多種脊椎動物ActRIIB蛋白（依出現順序分別為SEQ ID NO 22-27；以SEQ ID NO: 29揭示一致序列）與人類ActRIIA (SEQ ID NO: 28)之多序列排

比。

【實施方式】

詳述

1. 綜述

【0021】 在某些方面中，本發明係關於ActRIIB多肽。如本文所用之術語「ActRIIB」係指來源於任何物種之IIB型活化素受體（ActRIIB）蛋白及ActRIIB相關蛋白之家族。ActRIIB家族之成員一般為包含具有富含半胱氨酸區域之配位體結合胞外域、跨膜域及具有預測絲氨酸/蘇氨酸激酶特異性之細胞質域的所有跨膜蛋白。人類ActRIIA前驅蛋白（供比較用）及ActRIIB前驅蛋白之胺基酸序列分別於圖3（SEQ ID NO: 3）及圖4（SEQ ID NO: 4）中說明。

【0022】 術語「ActRIIB多肽」用於指代包含ActRIIB家族成員之任何天然產生多肽以及其保留有用活性之任何變體（包括突變體、片段、融合體及肽模擬物形式）之多肽。舉例而言，ActRIIB多肽包括衍生自序列與ActRIIB多肽之序列至少約80%一致且較佳至少85%、90%、95%、97%、99%或更高一致性的任何已知ActRIIB之序列的多肽。

【0023】 在一特定具體實例中，本發明係關於可溶性ActRIIB多肽。如本文所述之術語「可溶性ActRIIB多肽」一般係指包含ActRIIB蛋白之胞外域之多肽。如本文所用之術語「可溶性ActRIIB多肽」包括ActRIIB蛋白之任何天然產生胞外域以及其保留有用活性之任何變體（包括突變體、片段及肽模擬物形式）。舉例而言，ActRIIB蛋白之胞外域與配位體結合且一般可溶。可溶性ActRIIB多肽之實例包括圖2中所說明之ActRIIB可溶性多肽（SEQ ID NO: 2）。可溶性ActRIIB多肽之其他實例除ActRIIB蛋白之胞外域以外包含信號序列，例如圖10中所說明之序列（SEQ ID NO: 9-11）。該信號序列可為ActRIIB之原生

信號序列，或來自另一蛋白之信號序列，諸如組織纖維蛋白溶酶原活化劑（TPA）信號序列或蜜蜂蜂毒蛋白（honey bee melatin，HBM）信號序列。

【0024】 TGF- β 信號係由I型與II型絲胺酸/蘇胺酸激酶受體之異聚複合物介導，該等異聚複合物在配位體刺激後即使下游Smad蛋白磷酸化並活化（Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178）。此等I型及II型受體為包含具有富含半胱胺酸區域之配位體結合胞外域、跨膜域及具有預測絲胺酸/蘇胺酸特異性之細胞質域的所有跨膜蛋白。I型受體為信號轉導所必需；且II型受體為結合配位體及表現I型受體所需。I型及II型活化素受體在配位體結合後形成穩定複合物，使得I型受體由II型受體磷酸化。

【0025】 兩種相關II型受體ActRIIA與ActRIIB已被鑑別為活化素之II型受體（Mathews及Vale, 1991, Cell 65:973-982；Attisano等人, 1992, Cell 68: 97-108）。除活化素以外，ActRIIA及ActRIIB可與若干其他TGF- β 家族蛋白質（包括BMP7、Nodal、GDF8及GDF11）以生物化學方式相互作用（Yamashita等人, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226；Lee及McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311；Yeo及Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957；Oh等人, 2002, Genes Dev. 16:2749-54）。申請者已發現可溶性ActRIIA-Fc融合蛋白及ActRIIB-Fc融合蛋白具有實質上不同之活體內影響，其中ActRIIA-Fc對骨具有主要影響而ActRIIB-Fc對骨骼肌具有主要影響。

【0026】 在某些具體實例中，本發明係關於用主題ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）拮抗ActRIIB受體之配位體（亦稱作ActRIIB配位體）。因此，本發明之組合物及方法適用於治療與ActRIIB受體之一或多種配位體之異常活性相關之病症。ActRIIB受體之例示性配位體包括一些TGF- β 家族成員，諸如活化素、Nodal、GDF8、GDF11及BMP7。

【0027】 活化素為二聚多肽生長因子且屬於TGF- β 超家族。存在三種活

化素（A、B及AB），其為兩種密切相關之 β 子單元之同源二聚體/異源二聚體（ $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 及 $\beta_A\beta_B$ ）。在TGF- β 超家族中，活化素為可刺激卵巢細胞及胎盤細胞中激素產生，支持神經元細胞存活，根據細胞類型而正面或負面影響細胞週期進程，且至少在兩棲動物胚胎中誘導中胚層分化之獨特及多功能因子（DePaolo等人，1991, *Proc SocExp Biol Med.* 198:500-512；Dyson等人，1997, *Curr Biol.* 7:81-84；Woodruff, 1998, *Biochem Pharmacol.* 55:953-963）。此外，發現自受激人類單核白血球細胞分離之紅血球分化因子（EDF）與活化素A相同（Murata等人，1988, *PNAS*, 85:2434）。表明活化素A充當骨髓中紅血球生成之天然調節劑。在若干組織中，活化素信號轉導受其相關異源二聚體抑制素（inhibin）拮抗。舉例而言，在卵泡刺激激素（FSH）自垂體釋放期間，活化素促進FSH分泌及合成，而抑制素阻止FSH分泌及合成。可調節活化素生物活性及/或與活化素結合之其他蛋白質包括下文所述之卵泡抑素（FS）、卵泡抑素相關蛋白（FSRP）、 α_2 -巨球蛋白、瑟布魯斯（Cerberus）及內皮因子（endoglin）。

【0028】 Nodal蛋白在早期胚胎發生中在中胚層及內胚層誘導及形成，以及軸向結構（諸如心及胃）之後續組織方面具有功能。已證實背脊組織在發育中之脊椎動物胚胎中主要促成脊索及索前板之軸向結構，同時其募集周圍細胞以形成非軸向胚胎結構。Nodal似乎經I型及II型受體與稱為Smad蛋白之細胞內效應子信號轉導。新近研究支持ActRIIA及ActRIIB充當Nodal之II型受體之觀點（Sakuma等人, *Genes Cells.* 2002, 7:401-12）。表明Nodal配位體與其輔因子（例如cripto）相互作用以活化活化素I型及II型受體，該等受體使Smad2磷酸化。Nodal蛋白牽涉於對早期脊椎動物胚胎至關重要之許多事件中，該等事件包括中胚層形成、前部圖案化及左右軸特化。實驗證據已證實Nodal信號轉導活化pAR3-Lux，一種先前顯示特異性回應活化素及TGF- β 之螢光素酶報導體。然

而，Nodal不能誘導pTlx2-Lux，一種特異性回應骨形態發生蛋白之報導體。新近結果提供Nodal信號轉導由兩種活化素-TGF- β 路徑Smad（Smad2與Smad3）介導之直接生物化學證據。進一步證據已顯示細胞外cripto蛋白為Nodal信號轉導所需，使其區別於活化素或TGF- β 信號轉導。

【0029】 生長及分化因子-8（GDF8）亦稱為肌肉抑素。GDF8為骨骼肌質量之負性調節劑。GDF8在發育中及成人骨骼肌中高度表現。轉殖基因小鼠之GDF8無效突變（null mutation）特徵在於骨骼肌之明顯肥大及增生（McPherron等人, Nature, 1997, 387:83-90）。骨骼肌質量的類似增加在牛中天然產生之GDF8突變中顯而易見（Ashmore等人, 1974, Growth, 38:501-507；Swatland及Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757；McPherron及Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461；及Kambadur等人, Genome Res., 1997, 7:910-915），且在人類中更為顯而易見（Schuelke等人, N Engl J Med 2004;350:2682-8）。研究亦已顯示人類中與HIV感染相關之肌肉消瘦伴隨有GDF8蛋白表現增加（Gonzalez-Cadavid等人, PNAS, 1998, 95:14938-43）。另外，GDF8可調節肌肉特異性酶（例如肌酸激酶）產生且調節肌母細胞增殖（WO 00/43781）。GDF8前肽可與成熟GDF8域二聚體非共價結合，使其生物活性失活（Miyazono等人(1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415；Wakefield等人(1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654；及Brown等人(1990) Growth Factors, 3: 35-43）。與GDF8或結構相關蛋白質結合且抑制其生物活性之其他蛋白質包括卵泡抑素及潛在地卵泡抑素相關蛋白（Gamer等人(1999) Dev. Biol., 208: 222-232）。

【0030】 亦稱為BMP11之生長及分化因子-11（GDF11）為分泌蛋白（McPherron等人, 1999, Nat. Genet. 22: 260-264）。GDF11在小鼠發育期間於尾芽、肢芽、上頷弓及下頷弓及背根神經節中表現（Nakashima等人, 1999, Mech.

Dev. 80: 185-189)。GDF11在圖案化中胚層組織與神經組織中起獨特作用 (Gamer等人, 1999, Dev Biol., 208:222-32)。顯示GDF11為小雞四肢發育中軟骨生成及肌肉生成之負性調節劑 (Gamer等人, 2001, Dev Biol. 229:407-20)。GDF11於肌肉中之表現亦表明其在以類似於GDF8之方式調節肌肉生長中之作用。另外, GDF11於腦中之表現表明GDF11亦可具有與神經系統之功能相關之活性。令人關注地, 發現GDF11抑制嗅覺上皮中之神經生成 (Wu等人, 2003, Neuron. 37:197-207)。因此, GDF11在治療諸如肌肉疾病及神經退化性疾病 (例如肌肉萎縮性側索硬化) 之疾病方面可具有試管內及活體內應用。

【0031】 亦稱為成骨蛋白-1 (OP-1) 之骨形態發生蛋白 (BMP7) 已熟知以誘導軟骨及骨形成。另外, BMP7調節一大批生理過程。舉例而言, BMP7可為負責上皮骨生成現象之骨誘導因子。亦發現BMP7在鈣調節及骨動態平衡中起作用。如同活化素, BMP7與II型受體ActRIIA與IIB結合。然而, BMP7及活化素將不同I型受體募集至異聚受體複合物中。所觀測之主要BMP7 I型受體為ALK2, 而活化素排外性地與ALK4 (ActRIIB) 結合。BMP7及活化素引出獨特生物反應且活化不同Smad路徑 (Macias-Silva等人, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36)。

【0032】 在某些方面中, 本發明係關於某些ActRIIB多肽 (例如可溶性ActRIIB多肽) 一般在與ActRIIB活性相關之任何過程中拮抗ActRIIB配位體之信號轉導的用途。視情況, 本發明之ActRIIB多肽可拮抗ActRIIB受體之一或多種配位體, 諸如活化素、Nodal、GDF8、GDF11及BMP7, 且由此可適用於治療其他病症。

【0033】 因此, 本發明涵蓋在治療或預防與ActRIIB或ActRIIB配位體之異常活性相關之疾病或病狀中使用ActRIIB多肽。ActRIIB或ActRIIB配位體涉及於許多關鍵生物過程的調節中。歸因於其在此等過程中之關鍵功能, 其可為治

療性干預之所需靶。舉例而言，ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）可用於治療人類或動物病症或病狀。該等病症或病狀之實例包括（但不限於）：代謝障礙，諸如2型糖尿病、葡萄糖耐受性損傷、代謝症候群（例如X症候群）及由外傷（例如燒傷或氮失衡）誘導之胰島素抗性；脂肪組織病症（例如肥胖症）；肌肉及神經肌肉病症，諸如肌肉營養不良（包括杜興氏肌肉營養不良）；肌肉萎縮性側索硬化（ALS）；肌肉萎縮症；器官萎縮症；虛弱；腕隧道症候群；充血性阻塞性肺病；及肌肉減少症、惡病質及其他肌肉消瘦症候群。其他實例包括骨質疏鬆症，尤其在老年及/或停經後女性中；糖皮質激素誘發之骨質疏鬆症；骨質減少；骨關節炎；及骨質疏鬆症相關骨折。其他實例包括歸因於慢性糖皮質激素療法、過早性腺衰竭、雄激素抑制、維生素D缺乏、繼發性副甲狀腺高能症、營養不足及神經性厭食之低骨質量。此等病症及病狀於下文在「例示性治療用途」題下討論。

【0034】 在本發明之情形內且在使用各術語之特定情形中，本說明書中所使用之術語一般具有其在此項技術中之普通含義。某些術語於下文或本說明書中之其他地方加以討論，以在描述本發明之組合物及方法以及如何製造及使用其方面向從業者提供額外導則。術語之任何使用之範疇或含義將自使用該術語之特定情形顯而易見。

【0035】 「約」一般應意謂在給定量測之性質或精度下所量測之量的可接受誤差程度。典型地，例示性誤差程度處於給定值或值範圍之20%內、較佳10%內，且更佳5%內。

【0036】 其他且尤其在生物系統中，術語「約」可意謂處於給定值之一個數量級內、較佳5倍以內且更佳2倍以內之值。除非另有規定，否則本文所給出之數量為近似值，其意謂當未明確規定時可推斷出術語「約」。

【0037】 本發明之方法可包括將序列彼此比較之步驟，包括將野生型序

列與一或多個突變體（序列變體）比較。該等比較典型地包含（例如）使用序列排比程式及/或此項技術中所熟知之演算法（僅舉幾個例子，例如BLAST、FASTA及MEGALIGN）將聚合物序列排比。熟習此項技術者可易於瞭解，在該等排比中，當突變含有殘基插入或缺失時，序列排比將在不含有所插入或所缺失之殘基的聚合物序列中引入「空位」（典型地由破折號或「A」表示）。

【0038】 「同源」（所有其語法形式及拼法變化）係指具有「共同演化起源」之兩種蛋白質之間的關係，該等蛋白質包括來自相同有機體物種中之超家族之蛋白質以及來自不同有機體物種之同源蛋白質。該等蛋白質（及其編碼核酸）具有如由其序列相似性，根據一致性百分比抑或由特定殘基或基元及保守位置的存在所反映之序列同源性。

【0039】 術語「序列相似性」（所有其語法形式）係指在可能共用或可能不共用共同演化起源之核酸序列或胺基酸序列之間的一致性或對應性之程度。

【0040】 然而，在常見用法中及本發明應用中，術語「同源」當經諸如「高度」之副詞修飾時可指代序列相似性且可能或可能不涉及共同演化起源。

2. ActRIIB多肽

【0041】 在某些方面中，本發明係關於ActRIIB變體多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）。視情況，片段、功能變體及經修飾形式具有其對應野生型ActRIIB多肽之類似或相同生物活性。舉例而言，本發明之ActRIIB變體可與ActRIIB配位體（例如活化素A、活化素AB、活化素B、Nodal、GDF8、GDF11或BMP7）結合且抑制其功能。視情況，ActRIIB多肽調節諸如骨、軟骨、肌肉或脂肪之組織的生長。ActRIIB多肽之實例包括人類ActRIIB前驅多肽（SEQ ID NO: 4）及可溶性人類ActRIIB多肽（例如，SEQ ID NO: 2及9-11）。

【0042】 本案之揭示鑑別ActRIIB之功能活性部分及變體。申請者已確定

具有由Hilden等人 (Blood. 1994年4月15日; 83(8):2163-70) 揭示之序列的Fc融合蛋白 (其在對應於SEQ ID NO: 4之胺基酸64之位置處具有丙胺酸 (A64)) 對活化素及GDF-11具有相對較低的親和力。相比之下，在位置64處具有精胺酸 (R64) 之相同Fc融合蛋白具有處於低奈莫耳至高皮莫耳範圍內的對活化素及GDF-11之親和力。因此，具有R64之序列在本案之揭示中用作人類ActRIIB之野生型參考序列。

【0043】 Attisano等人 (Cell. 1992年1月10日; 68(1):97-108) 顯示ActRIIB之胞外域之C末端處脯胺酸結的缺失減小受體對活化素之親和力。在此所呈現之資料顯示含有SEQ ID NO: 4之胺基酸20-119之ActRIIB-Fc融合蛋白「ActRIIB(20-119)-Fc」相對於包括脯胺酸結區及完整近膜域之ActRIIB(20-134)-Fc與GDF-11及活化素之結合性減小。然而，即使脯胺酸結區遭破壞，ActRIIB(20-129)-Fc蛋白仍基本上保持與野生型相同之活性。因此，在胺基酸134、133、132、131、130及129處終止之ActRIIB胞外域皆預期具活性。類似地，並不預期殘基129-134中之任一者處之突變改變配位體結合親和力。在此支持下，P129及P130之突變並不實質上減小配位體結合性。因此，ActRIIB-Fc融合蛋白可早在胺基酸109 (最終半胱胺酸) 處終止，然而，預期在109及119處或109與119之間終止之形式具有減小之配位體結合性。胺基酸119具弱保守性且由此易於改變或截斷。在128處或稍後之處終止之形式保持配位體結合活性。在119及127處或119與127之間終止之形式將具有中間結合能力。根據臨床或實驗配置，可能需要使用此等形式中之任一者。

【0044】 在ActRIIB之N末端處，預期在胺基酸29處或之前起始之蛋白質將保持配位體結合活性。胺基酸29表示初始半胱胺酸。位置24處丙胺酸至天冬醯胺酸之突變在對配位體結合無實質性影響之情況下引入N-連接糖基化序列。此確認介於信號裂解肽與半胱胺酸交聯區之間、對應於胺基酸20-29之區域中的

突變具良好耐受性。詳言之，在位置20、21、22、23及24處起始之構築體將保持活性，且亦預期在位置25、26、27、28及29處起始之構築體保持活性。

【0045】 總而言之，ActRIIB之活性部分包含SEQ ID NO: 4之胺基酸29-109，且構築體可（例如）在對應於胺基酸20-29之殘基處起始且在對應於胺基酸109-134之位置處終止。其他實例包括在位置20-29或21-29處起始且在位置119-134、119-133或129-134、129-133處終止之構築體。其他實例包括在位置20-24（或21-24）處起始且在位置109-134（或109-133）、119-134（或119-133）或129-134（或129-133）處終止之構築體。亦涵蓋此等範圍內之變體，尤其與SEQ ID NO: 4之對應部分具有至少80%、85%、90%、95%或99%一致性的彼等變體。

【0046】 本案之揭示包括圖22中所示之複合ActRIIB結構之分析的結果，其證實配位體結合袋係由殘基Y31、N33、N35、L38至T41、E47、E50、Q53至K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78至N83、Y85、R87、A92及E94至F101界定。在此等位置處，預期保守突變將具耐受性，而K74A突變具良好耐受性，如同R40A、K55A、F82A及位置L79處之突變。R40在爪蟾（Xenopus）中為K，其指示此位置處之鹼性胺基酸將具耐受性。Q53在牛ActRIIB中為R且在爪蟾ActRIIB中為K，且由此包括R、K、Q、N及H之胺基酸在此位置處將具耐受性。因此，活性ActRIIB變體蛋白之通式為包含胺基酸29-109，但視情況在處於20-24範圍內之位置處起始且在處於129-134範圍內之位置終止，且在配位體結合袋中包含不超過1處、2處、5處、10處或15處保守胺基酸變化且在配位體結合袋中之位置40、53、55、74、79及/或82處包含零處、一或多處非保守變化的活性ActRIIB變體蛋白。該蛋白可與SEQ ID NO: 4之胺基酸29-109之序列保持高於80%、90%、95%或99%之序列一致性。結合袋外部之位點（在此可變性可尤其具良好耐受性）包括胞外域之胺基及羧基末端（如上所述）及位置42-46

及65-73。位置65處天冬醯胺酸至丙胺酸之變化（N65A）實際上改良A64背景中之配位體結合性，且由此預期對R64背景中之配位體結合性無有害影響。此變化可能消除A64背景中之N65處之糖基化，由此證實此區域中之顯著變化有可能具耐受性。儘管在位置64處R64A變化具弱耐受性，但R64K具良好耐受性，且由此另一鹼性殘基（諸如H）可具耐受性。

【0047】 ActRIIB在幾乎所有脊椎動物間具良好保守性，其中胞外域之較大段完全保守。與ActRIIB結合之許多配位體亦高度保守。因此，來自多種脊椎動物有機體之ActRIIB序列的比較提供對可變異之殘基的瞭解。由此，活性人類ActRIIB變體在來自另一脊椎動物ActRIIB之序列的對應位置處可包括一或多個胺基酸，或可包括與人類或其他脊椎動物序列中之殘基類似之殘基。以下實例說明此方法以定義活性ActRIIB變體。L46在爪蟾ActRIIB中為纈胺酸，且因此而此位置可改變且視情況可變為另一疏水性殘基（諸如V、I或F）或非極性殘基（諸如A）。E52在爪蟾中為K，其指示此位點可耐受多種變化，包括諸如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y之極性殘基及可能A。T93在爪蟾中為K，其指示廣泛結構變化在此位置處具耐受性，其中極性殘基有利，諸如S、K、R、E、D、H、G、P、G及Y。F108在爪蟾中為Y，且由此Y或其他疏水性基團（諸如I、V或L）應具耐受性。E111在爪蟾中為K，其指示帶電殘基在此位置處將具耐受性，包括D、R、K及H，以及Q及N。R112在爪蟾中為K，其指示鹼性殘基在此位置處具耐受性，包括R及H。位置119處之A具相對較弱的保守性且似乎齧齒動物中之P及爪蟾中之V同樣如此，由此基本上任何胺基酸在此位置處應具耐受性。

【0048】 本案之揭示證實添加又一N-連接糖基化位點（N-X-S/T）相對於ActRIIB(R64)-Fc形式增加ActRIIB-Fc融合蛋白之血清半衰期。藉由在位置24處引入天冬醯胺酸（A24N構築體），產生賦予較長半衰期之NXT序列。其他

NX(T/S)序列見於42-44 (NQS) 及65-67 (NSS) 處，儘管後者可能未經位置64處之R有效糖基化。N-X-S/T序列一般可在圖22中所界定之配位體結合袋之外之位置處引入。引入非內源性N-X-S/T序列之尤其合適之位點包括胺基酸20-29、20-24、109-134、120-134或129-134。N-X-S/T序列亦可引入介於ActRIIB序列與Fc或其他融合組份之間的連接子中。該位點可藉由將N引入關於原有S或T之正確位置中或藉由在對應於原有N之位置處引入S或T而以最小努力引入。因此，將產生N-連接糖基化位點之所需變異為：A24N、R64N、S67N（可能與N65A變異組合）、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S及R112T。預測曾經糖基化之任何S可在不產生免疫原性位點之情況下變為T，此係歸因於由糖基化所提供之保護。同樣地，預測曾經糖基化之任何T可變為S。因此，變異S67T及S44T涵蓋在內。同樣地，在A24N變體中，可使用S26T變異。因此，ActRIIB變體可包括一或多個其他非內源性N-連接糖基化一致序列。

【0049】 可改變位置L79以賦予變異活化素-肌肉抑素 (GDF-11) 結合特性。L79A或L79P使GDF-11結合性減小至比活化素結合性減小更大之程度。L79E或L79D保留GDF-11結合性。顯著地，L79E及L79D變體具有大大減小之活化素結合性。活體內實驗指示此等非活化素受體保持增加肌肉質量之顯著能力，但對其他組織顯示降低之影響。此等資料證實獲得對活化素具有降低之影響之多肽的合意性及可行性。

【0050】 所述變化可以多種方式組合。另外，本文所述之突變程式之結果指示在ActRIIB中存在通常對保守有益之胺基酸位置。此等位置包括位置64（鹼性胺基酸）、位置80（酸性或疏水性胺基酸）、位置78（疏水性，且尤其色胺酸）、位置37（酸性，且尤其天冬胺酸或麩胺酸）、位置56（鹼性胺基酸）、位置60（疏水性胺基酸，尤其苯丙胺酸或酪胺酸）。因此，在本文所揭

示之每一變體中，本案之揭示提供可保守之胺基酸之構架。可為保守所需之其他位置如下：位置52（酸性胺基酸）、位置55（鹼性胺基酸）、位置81（酸性）、98（極性或帶電，尤其E、D、R或K）。

【0051】 在某些具體實例中，ActRIIB多肽之經分離片段可藉由篩選自編碼ActRIIB多肽之核酸的對應片段重組產生之多肽而獲得（例如SEQ ID NO: 2及9-11）。另外，片段可使用此項技術中已知之技術（諸如習知Merrifield固相f-Moc或t-Boc化學）來化學合成。可（以重組方式或藉由化學合成）產生片段且對其測試以鑑別可充當（例如）ActRIIB蛋白或ActRIIB配位體之拮抗劑（抑制劑）或促效劑（活化劑）之彼等肽基片段。

【0052】 在某些具體實例中，ActRIIB多肽之功能變體具有與選自SEQ ID NO: 2及9-11之胺基酸序列至少75%一致的胺基酸序列。在某些狀況下，功能變體具有與選自SEQ ID NO: 2及9-11之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0053】 在某些具體實例中，本發明涵蓋藉由出於增強治療功效或穩定性（例如活體外存放期及對活體內蛋白水解降解之抗性）之目的而修飾ActRIIB多肽之結構來製造功能變體。經修飾之ActRIIB多肽亦可（例如）藉由胺基酸取代、缺失或添加而產生。舉例而言，合理地預期白胺酸經異白胺酸或纈胺酸、天冬胺酸酯經麩胺酸酯、蘇胺酸經絲胺酸的經分離置換或胺基酸經結構相關胺基酸的類似置換（例如保守突變）不會對所得分子之生物活性產生主要影響。保守置換為在胺基酸家族內發生之與其側鏈相關彼等置換。ActRIIB多肽之胺基酸序列的變化是否產生功能同源物可易於藉由評估變體ActRIIB多肽以類似於野生型ActRIIB多肽之方式在細胞中產生反應或以類似於野生型之方式與一或多種配位體（諸如活化素、GDF-11或肌肉抑素）結合的能力來確定。

【0054】 在某些特定具體實例中，本發明涵蓋在ActRIIB多肽之胞外域（亦稱作配位體結合域）中製造突變使得變體（或突變體）ActRIIB多肽具有變異之配位體結合活性（例如結合親和力或結合特異性）。在某些狀況下，該等變體ActRIIB多肽對特定配位體具有變異（升高或下降）之結合親和力。在其他狀況下，變體ActRIIB多肽對其配位體具有變異之結合特異性。

【0055】 舉例而言，本案之揭示提供相對於活化素與GDF8/GDF11優先結合之變體ActRIIB多肽。本案之揭示進一步確立該等多肽降低脫靶效應（off-target effect）之合意性，儘管該等選擇性變體可能對於治療肌肉質量的極大增加可能為治療作用所需且某種程度之脫靶效應為可接受之嚴重疾病而言較不為所需的。舉例而言，ActRIIB蛋白之胺基酸殘基，諸如E39、K55、Y60、K74、W78、D80及F101（圖13所示），係處於配位體結合袋中且介導與其配位體（諸如活化素及GDF8）之結合。因此，本發明提供ActRIIB受體之變異配位體結合域（例如GDF8結合域），其在彼等胺基酸殘基處包含一或多處突變。視情況，變異配位體結合域相對於ActRIIB受體之野生型配位體結合域對諸如GDF8之配位體可具有增加之選擇性。為說明起見，此等突變使變異配位體結合域對GDF8之選擇性增加超過活化素。視情況，變異配位體結合域具有相對於就野生型配位體結合域而言之比率高至少2倍、5倍、10倍或甚至100倍的活化素結合 K_d 與GDF8結合 K_d 之比率。視情況，變異配位體結合域具有相對於野生型配位體結合域高至少2倍、5倍、10倍或甚至100倍的抑制活化素 IC_{50} 與抑制GDF8 IC_{50} 之比率。視情況，變異配位體結合域以比抑制活化素之 IC_{50} 小至少2倍、5倍、10倍或甚至100倍之 IC_{50} 抑制GDF8。

【0056】 作為一特定實例，ActRIIB之配位體結合域之帶正電胺基酸殘基Asp（D80）可突變為不同胺基酸殘基使得變體ActRIIB多肽與GDF8而非活化素優先結合。較佳地，D80殘基變為選自由以下各者組成之群的胺基酸殘基：不

帶電胺基酸殘基、負電胺基酸殘基及疏水性胺基酸殘基。作為又一特定實例，疏水性殘基L79可變為酸性胺基酸天冬胺酸或麩胺酸以大大降低活化素結合性同時保持GDF11結合性。如熟習此項技術者應瞭解，多數所述突變、變體或修飾可在核酸水平上或在一些狀況下藉由轉譯後修飾或化學合成來製造。該等技術在此項技術中已為熟知。

【0057】 在某些具體實例中，本發明涵蓋ActRIIB多肽之特定突變以改變多肽之糖基化。ActRIIB多肽中之例示性糖基化位點於圖4中說明。該等突變可經選擇以引入或消除一或多個糖基化位點，諸如O-連接或N-連接糖基化位點。天冬醯胺酸連接糖基化識別位點一般包含由適當細胞糖基化酶特異性識別之三肽序列天冬醯胺酸-X-蘇胺酸（其中「X」為任何胺基酸）。變異亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至野生型ActRIIB多肽之序列中或使野生型ActRIIB多肽之序列經一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代而得（對於O-連接糖基化位點而言）。在糖基化識別位點之第一或第三胺基酸位置中之一或兩者處的多種胺基酸取代或缺失（及/或在第二位置處之胺基酸缺失）在經修飾之三肽序列處產生非糖基化。增加ActRIIB多肽上之碳水化合物部分之數目的另一方式為藉由使醣苷與ActRIIB多肽化學或酶促偶合。視所使用之偶合模式而定，可使糖與以下各者連接：（a）精胺酸及組胺酸；（b）游離羧基；（c）游離硫氫基，諸如半胱胺酸之彼等游離硫氫基；（d）游離羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之彼等游離羥基；（e）芳族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之彼等芳族殘基；或（f）麩醯胺酸之醯胺基。此等方法描述於1987年9月11日公開之WO 87/05330中及Aplin及Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306頁中，該等文獻以引用的方式併入本文中。移除存在於ActRIIB多肽上之一或多個碳水化合物部分可以化學方式及/或以酶促方式實現。化學脫糖基化可涉及（例如）將ActRIIB多肽暴露於化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物。

此處理使得除連接糖（N-乙醯基葡萄糖胺或N-乙醯基半乳糖胺）以外之多數或所有糖裂解，同時留下完整胺基酸序列。化學脫糖基化由Hakimuddin等人(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52及由Edge等人 (1981) Anal. Biochem. 118:131進一步描述。如由Thotakura等人(1987) Meth. Enzymol. 138:350所述，ActRIIB多肽上之碳水化合物部分的酶促裂解可藉由使用多種內切醣苷酶及外切醣苷酶來達成。當哺乳動物、酵母、昆蟲及植物細胞皆可引入可受ActRIIB多肽之胺基酸序列影響之不同糖基化模式時，該肽之序列適當時可視所使用之表現系統之類型而加以調整。儘管預期其他哺乳動物表現細胞系同樣適用，但一般而言，於人類中使用之ActRIIB蛋白將在提供適當糖基化之哺乳動物細胞系（諸如HEK293或CHO細胞系）中表現。

【0058】 本案之揭示進一步涵蓋產生ActRIIB多肽之變體、尤其組合變體組（視情況包括截斷變體）之方法；組合突變體組尤其適用於鑑別功能變體序列。篩選該等組合文庫之目的可在於產生（例如）具有變異特性（諸如變異藥物動力學或變異配位體結合性）的ActRIIB多肽變體。多種篩選檢定提供於下文中，且該等檢定可用於評估變體。舉例而言，ActRIIB多肽變體可針對與ActRIIB多肽結合、防止ActRIIB配位體與ActRIIB多肽結合之能力來篩選。

【0059】 ActRIIB多肽或其變體之活性亦可在基於細胞之檢定或活體內檢定中測試。舉例而言，可評估ActRIIB多肽變體對造骨細胞或前驅細胞中與骨產生相關之基因之表現的影響。必要時，其可在一或多種重組性ActRIIB配位體蛋白（例如BMP7）存在下進行，且可轉染細胞以產生ActRIIB多肽及/或其變體，及視情況ActRIIB配位體。同樣地，可將ActRIIB多肽投予小鼠或其他動物，且可評估一或多種骨特性，諸如密度或體積。亦可評估骨折之復原速率。類似地，可（例如）由下述檢定在肌肉細胞、脂肪細胞及神經元細胞中針對對此等細胞生長的任何影響測試ActRIIB多肽或其變體之活性。該等檢定在此項

技術中已為熟知且為常規的。SMAD反應性報導體基因可在該等細胞系中使用以監測對下游信號轉導的影響。

【0060】 可產生相對於天然產生之ActRIIB多肽具有選擇性效能之組合衍生變體。該等變體蛋白當自重組性DNA構築體表現時可在基因療法方案中使用。同樣地，突變可產生具有顯著不同於相應野生型ActRIIB多肽之細胞內半衰期的變體。舉例而言，可使變異蛋白質對蛋白水解降解或引起原生ActRIIB多肽破壞或以其他方式失活之其他過程更加穩定或較不穩定。該等變體及其編碼基因可用於藉由調節ActRIIB多肽之半衰期而改變ActRIIB多肽水平。舉例而言，短半衰期可引起更短暫之生物作用且當為誘導性表現系統之一部分時可允許更嚴格控制細胞內重組性ActRIIa多肽水平。

【0061】 在某些具體實例中，本發明之ActRIIB多肽除天然存在於ActRIIB多肽中之任何者以外可進一步包含轉譯後修飾。該等修飾包括（但不限於）：乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化及醯化。由此，經修飾之ActRIIB多肽可含有非胺基酸元素，諸如聚乙二醇、脂質、多醣或單醣，及磷酸酯。該等非胺基酸元素對ActRIIB多肽之功能性的影響可如本文對於其他ActRIIB多肽變體所述來測試。當藉由使初生形式之ActRIIB多肽裂解而在細胞中產生ActRIIB多肽時，轉譯後加工對於蛋白質之正確摺疊及/或功能而言亦為重要的。不同細胞（諸如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293）具有該等轉譯後活性之特定細胞機構及特徵機制且可經選擇以確保ActRIIB多肽之正確修飾及加工。

【0062】 在某些方面中，ActRIIB多肽之功能變體或經修飾形式包括具有至少一部分ActRIIB多肽及一或多個融合域之融合蛋白。該等融合域之熟知實例包括（但不限於）：多組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽S轉移酶（GST）、硫氧還蛋白（thioredoxin）、蛋白質A、蛋白質G、免疫球蛋白重鏈恆定區（例如

Fc)、麥芽糖結合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。融合域可經選擇以賦予所要特性。舉例而言,一些融合域尤其適用於藉由親和力層析分離融合蛋白。出於親和純化之目的,使用親和層析之相關基質,諸如麩胱甘肽結合樹脂、澱粉酶結合樹脂及鎳結合樹脂或鈷結合樹脂。該等基質中有許多可以「套組」形式獲得,諸如適用於(HIS₆(SEQ ID NO: 30))融合搭配物之Pharmacia GST純化系統及QIAexpress™系統(Qiagen)。作為另一實例,融合域可經選擇以有利於偵測ActRIIB多肽。該等偵測域之實例包括各種螢光蛋白(例如GFP)以及「抗原決定基標籤」,其通常為特定抗體可用之短肽序列。特定單株抗體可易於使用之熟知抗原決定基標籤包括FLAG、流感病毒紅血球凝集素(HA)及c-myc標籤。在一些狀況下,融合域具有蛋白酶裂解位點,諸如因子Xa或凝血酶之蛋白酶裂解位點,其允許相關蛋白酶部分消化融合蛋白且從而自其釋放重組蛋白。可接著由後續層析分離使所釋放之蛋白質自融合域分離。在某些較佳具體實例中,ActRIIB多肽與活體內穩定ActRIIB多肽之域(「穩定子」域)融合。「穩定」意謂增加血清半衰期之任何者,無論其係由於破壞減小、腎清除減小抑或其他藥物動力學效應而達成。已知與免疫球蛋白之Fc部分的融合賦予大範圍之蛋白質以所需藥物動力學特性。同樣地,與人血清白蛋白之融合可賦予所需特性。可選擇之其他類型融合域包括多聚(例如二聚、四聚)域及功能域(賦予其他生物功能,諸如進一步刺激肌肉生長)。

【0063】 作為一特定實例,本發明提供包含與Fc域融合之胞外(例如GDF8結合)域的作為GDF8拮抗劑之融合蛋白(例如SEQ ID NO: 13)。

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHPDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)
VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV

MHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

【0064】 較佳地，Fc域在諸如Asp-265、離胺酸322及Asn-434之殘基處具有一或多處突變（參見圖12）。在某些狀況下，具有此等突變中之一或多者（例如Asp-265突變）之突變Fc域相對於野生型Fc域與Fc γ 受體結合之能力減小。在其他狀況下，具有此等突變中之一或多者（例如Asn-434突變）之突變Fc域相對於野生型Fc域與I類MHC相關Fc受體（FcRN）結合之能力增加。

【0065】 應瞭解融合蛋白之不同元素可以與所要功能性相符之任何方式排列。舉例而言，可將ActRIIB多肽置放於異源域之C末端或者可將異源域置放於ActRIIB多肽之C末端。ActRIIB多肽域與異源域在融合蛋白中無須相鄰，且其他域或胺基酸序列可包括於任一域之C末端或N末端中或介於該等域之間。

【0066】 在某些具體實例中，本發明之ActRIIB多肽含有一或多種能穩定ActRIIB多肽之修飾。舉例而言，該等修飾增強ActRIIB多肽之試管內半衰期，增強ActRIIB多肽之循環半衰期或減少ActRIIB多肽之蛋白水解降解。該等穩定化修飾包括（但不限於）：融合蛋白（包括，例如包含ActRIIB多肽及穩定子域之融合蛋白）、糖基化位點之修飾（包括，例如將糖基化位點添加至ActRIIB多肽中），及碳水化合物部分之修飾（包括，例如自ActRIIB多肽移除碳水化合物部分）。在融合蛋白之狀況下，ActRIIB多肽與諸如IgG分子之穩定子域（例如Fc域）融合。如本文所用之術語「穩定子域」不僅係指如在融合蛋白之狀況下的融合域（例如Fc），而且包括諸如碳水化合物部分之非蛋白類修飾或諸如聚乙二醇之非蛋白類聚合物。

【0067】 在某些具體實例中，本發明製造可用之經分離及/或經純化形式之ActRIIB多肽，其係與其他蛋白質分離或以其他方式實質上無其他蛋白質。

【0068】 在某些具體實例中，本發明之ActRIIB多肽（未經修飾或經修飾）可由多種此項技術中已知之技術產生。舉例而言，該等ActRIIB多肽可使

用標準蛋白質化學技術來合成，諸如Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993)及Grant G. A. (編)，Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)中所述之彼等技術。另外，自動化肽合成器可購得（例如Advanced ChemTech型號396；Milligen/Bioscience 9600）。或者，ActRIIB多肽、其片段或變體可使用如此項技術中所熟知之多種表現系統（例如大腸桿菌、中國倉鼠卵巢細胞、COS細胞、桿狀病毒）來重組產生。在又一具體實例中，經修飾或未經修飾之ActRIIB多肽可藉由使用（例如）蛋白酶（例如胰蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶）或成對鹼性胺基酸轉化酶（PACE）消化天然產生或重組產生之全長ActRIIB多肽來產生。電腦分析（使用市售軟體，例如MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.）可用於鑑別蛋白質裂解位點。或者，該等ActRIIB多肽可由（諸如）此項技術中已知之標準技術，諸如由化學裂解（例如溴化氰、胍）而自天然產生或重組產生之全長ActRIIB多肽產生。

3.編碼ActRIIB多肽之核酸

【0069】 在某些方面中，本發明提供編碼ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）中之任一者（包括本文所揭示之變體中之任一者）之經分離核酸及/或重組性核酸。舉例而言，SEQ ID NO: 8編碼天然產生之ActRIIB前驅多肽，而SEQ ID NO: 6編碼可溶性ActRIIB多肽。主題核酸可為單股或雙股。該等核酸可為DNA或RNA分子。此等核酸可（例如）在製造ActRIIB多肽之方法中使用或用作直接治療劑（例如在基因療法中）。

【0070】 在某些方面中，編碼ActRIIB多肽之主題核酸應進一步理解為包括為SEQ ID NO: 8之變體的核酸。變體核苷酸序列包括因一或多處核苷酸取代、添加或缺失而不同之序列，諸如等位基因變體；且由此將包括不同於SEQ ID NO: 8所表示之編碼序列之核苷酸序列的編碼序列。

【0071】 在某些具體實例中，本發明提供與SEQ ID NO: 6至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%一致之經分離核酸序列或重組性核酸序列。一般熟習此項技術者應瞭解，與SEQ ID NO: 6及SEQ ID NO: 6之變體互補之核酸序列亦處於本發明之範疇內。在其他具體實例中，本發明之核酸序列可為經分離的、重組性的及/或與異源核苷酸序列融合，或在DNA文庫中。

【0072】 在其他具體實例中，本發明之核酸亦包括在高度嚴格條件下與SEQ ID NO: 6所表示之核苷酸序列、SEQ ID NO: 6之互補序列或其片段雜交之核苷酸序列。如上文所討論，一般熟習此項技術者應易於瞭解，可改變促進DNA雜交之適當嚴格度條件。一般熟習此項技術者應易於瞭解，可改變促進DNA雜交之適當嚴格度條件。舉例而言，吾人可在約45°C下於6.0 × 氯化鈉/檸檬酸鈉（SSC）中進行雜交，接著在50°C下用2.0 × SSC洗滌。舉例而言，洗滌步驟中之鹽濃度可選自50°C下約2.0 × SSC之低嚴格度至50°C下約0.2 × SSC之高嚴格度。另外，洗滌步驟中之溫度可自室溫（約22°C）之低嚴格度條件增至約65°C之高嚴格度條件。溫度與鹽均可改變，或可將溫度或鹽濃度保持恆定同時改變另一變數。在一具體實例中，本發明提供在室溫下6 × SSC之低嚴格度條件下雜交、接著在室溫下於2 × SSC中洗滌之核酸。

【0073】 因遺傳密碼之簡并而不同於如SEQ ID NO: 6中所述之核酸的經分離核酸亦處於本發明之範疇內。舉例而言，許多胺基酸係由一個以上三聯體表示。指定同一胺基酸之密碼子或同義密碼子（例如CAU及CAC為組胺酸之同義密碼子）可引起不影響蛋白質之胺基酸序列的「靜默」突變。然而，預期不引起主題蛋白質之胺基酸序列變化之DNA序列多態現象將存在於哺乳動物細胞當中。熟習此項技術者應瞭解，編碼特定蛋白質之核酸之一或多個核苷酸（至多約3-5%之核苷酸）的此等變化可因天然等位基因變化而存在於特定物種之個體當中。任何及所有該等核苷酸變化及所得胺基酸多態現象處於本發明之範疇

內。

【0074】 在某些具體實例中，本發明之重組性核酸可在表現構築體中與一或多個調節核苷酸序列以可操作方式連接。調節核苷酸序列一般將適於供表現用之宿主細胞。眾多類型之適當表現載體及合適之調節序列在此項技術中已知用於多種宿主細胞。典型地，該或該等調節核苷酸序列可包括（但不限於）：啟動子序列、前導序列或信號序列、核糖體結合位點、轉錄起始及終止序列、轉譯起始及終止序列，及強化子序列或活化子序列。如此項技術中已知之組成性或誘導性啟動子為本發明所涵蓋。啟動子可為天然產生之啟動子或組合一一個以上啟動子之元素的雜合啟動子。表現構築體可存在於在細胞中離合染色小體（諸如質體）上，或可將表現構築體插入染色體中。在一較佳具體實例中，表現載體含有可選擇標記基因以允許選擇經轉型之宿主細胞。可選擇標記基因在此項技術中已為熟知且將隨所使用之宿主細胞而變。

【0075】 在本發明之某些方面中，主題核酸係提供於包含編碼ActRIIB多肽之核苷酸序列的表現載體中且與至少一個調節序列以可操作方式連接。調節序列經技術認可且經選擇以引導ActRIIB多肽表現。因此，術語調節序列包括啟動子、強化子及其他表現控制元素。例示性調節序列描述於Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)中。舉例而言，當與DNA序列以操作方式連接時控制該DNA序列表現之多種表現控制序列中之任一者可在等載體中使用以表現編碼ActRIIB多肽之DNA序列。該等有用之表現控制序列包括（例如）SV40之早期及晚期啟動子、tet啟動子、腺病毒或細胞巨大病毒即刻早期啟動子、RSV啟動子、lac系統、trp系統、TAC或TRC系統、表現由T7 RNA聚合酶引導之T7啟動子、噬菌體 λ 之主要操縱子及啟動子區、fd鞘蛋白之控制區、3-磷酸甘油酸激酶或其他醣解酶之啟動子、酸性磷酸酶之啟動子（例如Pho5）、酵母 α -交配型因子之啟動

子、桿狀病毒系統之多面體啟動子及已知控制原核或真核細胞或其病毒之基因表現的其他序列，及其各種組合。應瞭解，表現載體之設計可視諸如待轉型之宿主細胞的選擇及/或欲待表現之蛋白質的類型而定。此外，亦應考慮載體之複本數、控制彼複本數之能力及由載體編碼之任何其他蛋白質（諸如抗生素標記）的表現。

【0076】 本發明之重組性核酸可藉由將所選殖之基因或其部分接合至適合用於原核細胞、真核細胞（酵母、鳥類、昆蟲或哺乳動物）或二者中之表現的載體中來產生。產生重組性ActRIIB多肽之表現媒劑包括質體及其他載體。舉例而言，合適之載體包括以下類型之質體：供原核細胞（諸如大腸桿菌（*E. coli*））中之表現用的衍生自pBR322之質體、衍生自pEMBL之質體、衍生自pEX之質體、衍生自pBTac之質體及衍生自pUC之質體。

【0077】 一些哺乳動物表現載體含有有利於載體於細菌中繁殖之原核序列與一或多個在真核細胞中表現之真核轉錄單元。衍生自pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及pHyg之載體為適合於真核細胞之轉染的哺乳動物表現載體之實例。一些此等載體經來自細菌質體（諸如pBR322）之序列修飾以有利於原核細胞與真核細胞中之複製及耐藥性選擇。或者，病毒之衍生物，諸如牛乳頭狀瘤病毒（BPV-1）或愛-巴病毒（Epstein-Barr virus）（pHEBo、衍生自pREP，及p205），可用於在真核細胞中瞬間表現蛋白質。其他病毒（包括反轉錄病毒）表現系統之實例可見於下文基因療法傳遞系統之描述中。質體製備中及宿主有機體轉型中所使用之各種方法在此項技術中已為熟知。對於原核細胞與真核細胞之其他合適之表現系統以及一般重組程序，參見*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 第2版，Sambrook, Fritsch及Maniatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 第16章及第17章。在一些情況下，可能需要藉由使用桿

狀病毒表現系統來表現重組性多肽。該等桿狀病毒表現系統之實例包括衍生自pVL之載體（諸如pVL1392、pVL1393及pVL941）、衍生自pAcUW之載體（諸如pAcUW1），及衍生自pBlueBac之載體（諸如含有pBlueBac III之 β -gal）。

【0078】 在一較佳具體實例中，載體將經設計用於在CHO細胞中產生主題ActRIIB多肽，該載體諸如Pcmv-Script載體（Stratagene, La Jolla, Calif.）、pcDNA4載體（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）及pCI-neo載體（Promega, Madison, Wisc.）。將顯而易見，主題基因構築體可用於促成主題ActRIIB多肽在於培養物中繁殖之細胞中表現，（例如）以產生包括融合蛋白或變體蛋白之蛋白質以供純化。

【0079】 本發明亦係關於經重組性基因轉染之宿主細胞，該重組性基因包括主題ActRIIB多肽中之一或多者的編碼序列（例如SEQ ID NO: 8）。該宿主細胞可為任何原核細胞或真核細胞。舉例而言，本發明之ActRIIB多肽可在諸如大腸桿菌之細菌細胞、昆蟲細胞（例如，使用桿狀病毒表現系統）、酵母或哺乳動物細胞中表現。其他合適之宿主細胞為熟習此項技術者所知。

【0080】 因此，本發明進一步係關於產生主題ActRIIB多肽之方法。舉例而言，可在適當條件下培養經編碼ActRIIB多肽之表現載體轉染之宿主細胞以允許ActRIIB多肽之表現發生。可使ActRIIB多肽自含有ActRIIB多肽之細胞與培養基之混合物分泌並分離。或者，可使ActRIIB多肽保持於細胞質中或膜部分中，且將細胞收集、溶解並分離蛋白質。細胞培養物包括宿主細胞、培養基及其他副產物。供細胞培養用之合適培養基在此項技術中已為熟知。可使用此項技術中已知用於純化蛋白質之技術使主題ActRIIB多肽自細胞培養基、宿主細胞或二者分離，該等技術包括離子交換層析、凝膠過濾層析、超濾、電泳，及使用對ActRIIB多肽之特定抗原決定基具特異性之抗體進行免疫親和純化。在一較佳具體實例中，ActRIIB多肽為含有有利於其純化之域的融合蛋白。

【0081】 在另一具體實例中，編碼純化前導序列，諸如處於重組性ActRIIB多肽之所要部分之N末端的多聚(His)/腸激酶裂解位點序列的融合基因可允許由親和層析使用Ni²⁺金屬樹脂純化所表現之融合蛋白。可接著藉由用腸激酶處理來隨後移除純化前導序列以提供經純化之ActRIIB多肽（例如，參見Hochuli等人, (1987) *J. Chromatography* 411:177；及Janknecht等人, *PNAS USA* 88:8972）。

【0082】 製造融合基因之技術已為熟知。基本上，編碼不同多肽序列之各種DNA片段的接合係根據習知技術，使用供接合用之鈍端或交錯端末端、提供適當末端之限制酶消化、適當時黏性末端之填入、避免不合需要之接合的鹼性磷酸酶處理及酶促接合來進行。在另一具體實例中，融合基因可由包括自動化DNA合成器之習知技術來合成。或者，基因片段之PCR擴增可使用錨定引子來進行，該等錨定引子在兩個連續基因片段之間產生互補懸垂體，隨後可使該兩個連續基因片段黏接以產生嵌合基因序列（參見，例如*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等人編, John Wiley & Sons: 1992）。

4.抗體

【0083】 本發明之另一方面係關於抗體。與ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）特異性反應且與ActRIIB多肽競爭性地結合之抗體可用作ActRIIB多肽活性之拮抗劑。舉例而言，藉由使用衍生自ActRIIB多肽之免疫原，抗蛋白/抗肽抗血清或單株抗體可由標準方案製成（參見，例如*Antibodies: A Laboratory Manual* 由Harlow及Lane編(Cold Spring Harbor Press: 1988)）。諸如小鼠、倉鼠或兔之哺乳動物可用免疫原性形式之ActRIIB多肽、能引出抗體反應之抗原片段，或融合蛋白免疫。賦予蛋白質或肽以免疫原性之技術包括與載劑結合或此項技術中所熟知之其他技術。可在佐劑存在下投予ActRIIB多肽之免疫原性部分。免疫之進程可藉由偵測血漿或血清中之抗體效價來監測。標準

ELISA或其他免疫檢定可與作為抗原之免疫原一起使用以評估抗體水平。

【0084】 用ActRIIB多肽之抗原製劑使動物免疫後，可獲得抗血清且必要時可自血清分離多株抗體。為產生單株抗體，可自經免疫之動物收集抗體產生細胞（淋巴細胞）且由標準體細胞融合程序使其與永生化細胞（諸如骨髓瘤細胞）融合以得到融合瘤細胞。該等技術在此項技術中已為熟知，且包括（例如）融合瘤技術（最初由Kohler及Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497開發）、人類B細胞融合瘤技術（Kozbar等人，(1983) *Immunology Today*, 4: 72）及產生人類單株抗體之EBV-融合瘤技術（Cole等人，(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. 第77-96頁）。可以免疫化學方式篩選融合瘤細胞以產生與ActRIIB多肽特異性反應之抗體及自包含該等融合瘤細胞之培養物分離之單株抗體。

【0085】 如本文所用之術語「抗體」意欲包括其亦與主題ActRIIB多肽特異性反應之片段。可使用習知技術使抗體片段化且以與上文對於整個抗體所述相同之方式針對效用來篩選片段。舉例而言，F(ab)₂片段可藉由用胃蛋白酶處理抗體而產生。可處理所得F(ab)₂片段以還原雙硫橋來產生Fab片段。本發明之抗體進一步意欲包括具有由該抗體之至少一個CDR區所賦予之對ActRIIB多肽之親和力的雙特異性、單鏈及嵌合及人類化分子。在較佳具體實例中，抗體進一步包含與其連接且能被偵測之標記（例如，標記可為放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子）。

【0086】 在某些較佳具體實例中，本發明之抗體為單株抗體，且在某些具體實例中，本發明獲得產生新穎抗體之可用方法。舉例而言，產生與ActRIIB多肽特異性結合之單株抗體之方法可包含將一定量之包含有效刺激可偵測性免疫反應之ActRIIB多肽的免疫原性組合物投予小鼠，自該小鼠獲得抗體產生細胞（例如，來自脾之細胞）且使該等抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合

以獲得抗體產生融合瘤，且測試該等抗體產生融合瘤以鑑別產生與ActRIIB多肽特異性結合之單株抗體的融合瘤。一旦獲得，即可在細胞培養物中、視情況在衍生自融合瘤之細胞產生與ActRIIB多肽特異性結合之單株抗體的培養條件下使融合瘤繁殖。可自細胞培養物純化單株抗體。

【0087】 如關於抗體所用之形容詞「與...特異性反應之」意欲意謂，如此項技術中一般瞭解，抗體在受關注抗原（例如ActRIIB多肽）與其他非受關注抗原之間具足夠選擇性使得該抗體適用於在最小量下偵測特定類型之生物樣本中受關注抗原的存在。在使用抗體之某些方法（諸如治療性應用）中，較高結合特異性程度可為所需的。單株抗體一般具有有效區分所要抗原與交叉反應多肽的較大趨勢（與多株抗體相比）。一種影響抗體:抗原相互作用之特異性的特徵為抗體對抗原之親和力。儘管所要特異性可以一定範圍之不同親和力來達成，但一般較佳之抗體將具有約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更小之親和力（解離常數）。

【0088】 另外，用於篩選抗體以鑑別所需抗體之技術可影響所獲得之抗體之特性。舉例而言，若抗體有待用於結合溶液中之抗原，則可能需要測試溶液結合性。多種不同技術可用於測試抗體與抗原之間的相互作用以鑑別尤其所需之抗體。該等技術包括ELISA、表面電漿共振結合檢定（例如Biacore結合檢定，Bia-core AB, Uppsala, Sweden）、夾心檢定（例如IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland之順磁性珠粒系統）、西方墨點法、免疫沈澱檢定及免疫組織化學法。

【0089】 在某些方面中，本案之揭示提供與可溶性ActRIIB多肽結合之抗體。該等抗體可幾乎如上所述使用可溶性ActRIIB多肽或其片段作為抗原來產生。此類型之抗體可用於（例如）偵測生物樣本中之ActRIIB多肽及/或監測個體中之可溶性ActRIIB多肽水平。在某些狀況下，與可溶性ActRIIB多肽特異性

結合之抗體可用於調節ActRIIB多肽及/或ActRIIB配位體之活性，從而調節（促進或抑制）諸如骨、軟骨、肌肉、脂肪及神經元之組織的生長。

5.篩選檢定

【0090】 在某些方面中，本發明係關於主題ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）鑑別作為ActRIIB多肽之促效劑或拮抗劑之化合物（藥劑）的用途。可在諸如骨、軟骨、肌肉、脂肪及/或神經元之組織中測試經此篩選所鑑別之化合物以評估其調節試管內組織生長之能力。視情況，可在動物模型中進一步測試此等化合物以評估其調節活體內組織生長之能力。

【0091】 存在眾多方法以篩選藉由靶向ActRIIB多肽而調節組織生長之治療劑。在某些具體實例中，可進行化合物之高產量篩選以鑑別擾動ActRIIB介導之對骨、軟骨、肌肉、脂肪及/或神經元生長之影響的藥劑。在某些具體實例中，進行檢定以篩選並鑑別特異性抑制或減少ActRIIB多肽與其結合搭配物結合之化合物，該結合搭配物諸如ActRIIB配位體（例如活化素、Nodal、GDF8、GDF11或BMP7）。或者，可使用檢定以鑑別增強ActRIIB多肽與其結合蛋白（諸如ActRIIB配位體）結合之化合物。在又一具體實例中，可由化合物與ActRIIB多肽相互作用之能力來鑑別該等化合物。

【0092】 多種檢定格局將足夠，且根據本案之揭示，本文中未明確描述之彼等檢定格局仍為一般熟習此項技術者所瞭解。如本文所述，本發明之測試化合物（藥劑）可由任何組合化學方法產生。或者，主題化合物可為活體內或試管內合成之天然產生生物分子。有待於針對充當組織生長之調節劑的能力進行測試之化合物（藥劑）可（例如）由細菌、酵母、植物或其他有機體產生（例如天然產物），以化學方式產生（例如小分子，包括肽模擬物），或以重組方式產生。為本發明所涵蓋之測試化合物包括非肽基有機分子、肽、多肽、肽模擬物、糖、激素及核酸分子。在一特定具體實例中，測試藥劑為具有小於

約2,000道爾頓之分子量的小有機分子。

【0093】 本發明之測試化合物可以單一離散實體形式提供，或提供於具有較高複雜性之文庫（諸如由組合化學所製成之文庫）中。此等文庫可包含（例如）醇、烷基鹵化物、胺、醯胺、酯、醛、醚及其他種類之有機化合物。測試化合物至測試系統之呈現可呈經分離之形式或呈化合物之混合物形式（尤其在初始篩選步驟中）。視需要，化合物可視情況經其他化合物衍生化且具有有利於化合物分離之衍生基團。衍生基團之非限制性實例包括生物素、螢光素、地高辛（digoxigenin）、綠色螢光蛋白、同位素、多組胺酸、磁性珠粒、麩胱甘肽S轉移酶（GST）、光可活化交聯劑或其任何組合。

【0094】 在測試化合物及天然提取物之文庫的許多藥物篩選程式中，需要高產量檢定以使給定時段中調查之化合物的數目最大。在諸如可以經純化或經半純化之蛋白質得出之無細胞系統中所進行之檢定通常較佳作為「初級」篩選，因為可產生該等檢定以允許快速顯影且相對容易地偵測由測試化合物介導之分子靶的變異。此外，在試管內系統中一般可忽略測試化合物之細胞毒性或生物可用性的作用，檢定替代地主要集中於藥物對分子靶的影響，該影響可在ActRIIB多肽與其結合蛋白（例如ActRIIB配位體）之間的結合親和力之變異中顯現。

【0095】 僅為說明起見，在本發明之一例示性篩選檢定中，使受關注化合物與通常能與適於檢定意向之ActRIIB配位體結合之經分離及經純化ActRIIa多肽接觸。接著將含有ActRIIB配位體之組合物添加至化合物與ActRIIB多肽之混合物中。ActRIIB/ActRIIB配位體複合物的偵測及量化提供測定化合物抑制（或加強）ActRIIB多肽與其結合蛋白之間的複合物形成之功效的方式。化合物之功效可藉由自使用多個濃度之測試化合物獲得之數據產生劑量反應曲線來評估。此外，亦可進行對照檢定以提供供比較用之基線。舉例而言，在對照檢

定中，將經分離及經純化之ActRIIB配位體添加至含有ActRIIB多肽之組合物中，且在不存在測試化合物下對ActRIIB/ActRIIB配位體複合物的形成進行定量。應瞭解，一般而言，混合反應物之次序可改變，且可同時混合。此外，替代經純化之蛋白質，可使用細胞提取物及溶解產物以促成合適之無細胞檢定系統。

【0096】 ActRIIB多肽與其結合蛋白之間的複合物形成可由多種技術來偵測。舉例而言，複合物形成之調節可使用（例如）諸如經放射性標記（例如 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H ）、經螢光標記（例如FITC）或經酶促標記之ActRIIB多肽或其結合蛋白之經可偵測標記蛋白質，由免疫檢定或由層析偵測進行定量。

【0097】 在某些具體實例中，本發明涵蓋螢光偏振檢定及螢光共振能量轉移（FRET）檢定直接或間接量測ActRIIB多肽與其結合蛋白之間的相互作用程度之用途。另外，其他偵測模式，諸如基於光波導（PCT公開案WO 96/26432及美國專利第5,677,196號）、表面電漿共振（SPR）、表面電荷感測器及表面力感測器之彼等偵測模式，與本發明之許多具體實例相容。

【0098】 此外，本發明涵蓋相互作用陷阱檢定（亦稱為「雙雜交檢定」）之用途，其係用於鑑別破壞或加強ActRIIB多肽與其結合蛋白之間的相互作用之藥劑。參見，例如美國專利第5,283,317號；Zervos等人(1993) Cell 72:223-232；Madura等人(1993) J Biol Chem 268:12046-12054；Bartel等人(1993) Biotechniques 14:920-924；及Iwabuchi等人(1993) Oncogene 8:1693-1696。在一特定具體實例中，本發明涵蓋反向雙雜交系統鑑別使ActRIIB多肽與其結合蛋白之間的相互作用解離之化合物（例如小分子或肽）的用途。參見，例如Vidal及Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29；Vidal及Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81；及美國專利第5,525,490號、第5,955,280號及第5,965,368號。

【0099】 在某些具體實例中，由主題化合物與本發明之ActRIIB多肽相互作用之能力來鑑別該等主題化合物。化合物與ActRIIB多肽之間的相互作用可為共價或非共價的。舉例而言，該相互作用可在蛋白質水平上使用包括光交聯、經放射性標記之配位體結合及親和層析之試管內生物化學方法來鑑別（Jakoby WB等人, 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1）。在某些狀況下，化合物可在基於機制之檢定中篩選，該檢定諸如偵測與ActRIIB多肽結合之化合物的檢定。其可包括固相或液相結合事件。或者，可會編碼ActRIIB多肽之基因經報導體系統（例如 β -半乳糖苷酶、螢光素酶或綠色螢光蛋白）轉染至細胞中且較佳由高產量篩選針對文庫或以該文庫之個別成員進行篩選。可使用其他基於機制之結合檢定，例如偵測自由能變化之結合檢定。可用固定於孔、珠粒或晶片或由經固定抗體捕捉或由毛細電泳法解析之靶來進行結合檢定。通常可使用比色法或螢光法或表面電漿共振來偵測所結合之化合物。

【0100】 在某些方面中，本發明提供（例如）藉由拮抗ActRIIB多肽及/或ActRIIB配位體之功能來刺激肌肉生長且增加肌肉質量之方法及藥劑。因此，可於整個細胞或組織中在試管內或活體內測試所鑑別之任何化合物以確認其調節肌肉生長之能力。此項技術中已知之多種方法可用於此目的。舉例而言，進行本發明之方法以使經藉由與ActRIIB配位體（例如GDF8）結合而活化之ActRIIB蛋白的信號轉導已得以減少或抑制。應瞭解，有機體之肌肉組織的生長將使得該有機體之肌肉質量與經ActRIIB蛋白之信號轉導尚未受如此影響之對應有機體（或有機體群體）之肌肉質量相比增加。

【0101】 舉例而言，ActRIIB多肽或測試化合物對肌肉細胞生長/增殖的影響可藉由量測與肌原細胞增殖相關之Pax-3及Myf-5之基因表現及與肌肉分化相關之MyoD之基因表現來測定（例如Amthor等人, *Dev Biol.* 2002, 251:241-57）。已知GDF8下調Pax-3及Myf-5之基因表現，且阻止MyoD之基因表現。預

期ActRIIB多肽或測試化合物拮抗GDF8之此活性。基於細胞之檢定的另一實例包括在ActRIIB多肽或測試化合物存在下量測肌母細胞（諸如C(2)C(12)肌母細胞）之增殖（例如Thomas等人, J Biol Chem. 2000, 275:40235-43）。

【0102】 本發明亦涵蓋量測肌肉質量及強度之活體內檢定。舉例而言，Whittemore等人（Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71）揭示量測小鼠之增加之骨骼肌質量及增加之握緊強度（grip strength）的方法。視情況，此方法可用於測定測試化合物（例如ActRIIB多肽）對肌肉疾病或病狀（例如肌肉質量受限制之彼等疾病）的治療作用。

【0103】 在某些方面中，本發明提供調節（刺激或抑制）骨形成且增加骨質量之方法及藥劑。因此，可於整個細胞或組織中在試管內或活體內測試所鑑別之任何化合物以確認其調節骨或軟骨生長之能力。此項技術中已知之多種方法可用於此目的。

【0104】 舉例而言，可藉由在基於細胞之檢定中量測Msx2誘導或骨祖細胞至造骨細胞之分化來測定ActRIIB多肽或測試化合物對骨或軟骨生長的影響（參見，例如Daluiski等人, Nat Genet. 2001, 27(1):84-8；Hino等人, Front Biosci. 2004, 9:1520-9）。基於細胞之檢定的另一實例包括分析間質祖細胞及造骨細胞中主題ActRIIB多肽及測試化合物之成骨活性。為說明起見，構築表現ActRIIB多肽之重組性腺病毒以感染分化多能間質祖細胞C3H10T1/2細胞、前造骨細胞C2C12細胞及造骨細胞TE-85細胞。接著藉由量測鹼性磷酸酶、骨鈣化素及基質礦化的誘導來測定成骨活性（參見，例如Cheng等人, J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8):1544-52）。

【0105】 本發明亦涵蓋量測骨或軟骨生長之活體內檢定。舉例而言，Namkung-Matthai等人, Bone, 28:80-86 (2001)揭示研究骨折後早期骨修復之大鼠骨質疏鬆模型。Kubo等人, Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202

(1999)亦揭示研究骨折後晚期骨修復之大鼠骨質疏鬆模型。此等文獻對於其關於骨質疏鬆性骨折之研究之大鼠模型的揭示內容全部以引用的方式併入本文中。在某些方面中，本發明使用此項技術中已知之骨折復原檢定之用途。此等檢定包括骨折技術、組織學分析及生物力學分析，其描述於（例如）美國專利第6,521,750號中，該專利對於其引起以及量測骨折程度及修復過程之實驗程序之揭示內容全部以引用的方式併入。

【0106】 在某些方面中，本發明提供控制增重及肥胖之方法及藥劑。在細胞水平上，脂肪細胞增殖及分化在肥胖發展方面至關重要，其導致額外脂肪細胞產生。因此，可於整個細胞或組織中在試管內或活體內測試所鑑別之任何化合物以藉由量測脂肪細胞增殖或分化來確認其調節脂肪生成之能力。此項技術中已知之多種方法可用於此目的。舉例而言，ActRIIB多肽（例如可溶性ActRIIB多肽）或測試化合物對脂肪生成的影響可藉由在基於細胞之檢定中量測3T3-L1前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞，諸如藉由觀測三醯化甘油於油紅O染色囊中之積聚及藉由諸如FABP（aP2/422）及PPAR γ 2之某些脂肪細胞標記之出現來測定。參見，例如Reusch等人，2000, Mol Cell Biol. 20:1008-20；Deng等人，2000, Endocrinology. 141:2370-6；Bell等人，2000, Obes Res. 8:249-54。基於細胞之檢定的另一實例包括（諸如）藉由監測溴脫氧尿苷（BrdU）-陽性細胞來分析ActRIIB多肽及測試化合物在脂肪細胞或脂肪細胞前驅細胞（例如3T3-L1細胞）增殖中之作用。參見，例如Pico等人，1998, Mol Cell Biochem. 189:1-7；Masuno等人，2003, Toxicol Sci. 75:314-20。

【0107】 應瞭解本發明之篩選檢定不僅應用於主題ActRIIB多肽及ActRIIB多肽之變體，而且應用於包括ActRIIB多肽之促效劑及拮抗劑的任何測試化合物。另外，此等篩選檢定適用於藥物靶驗證及品質控制目的。

6.例示性治療用途

【0108】 在某些具體實例中，本發明之組合物（例如ActRIIB多肽）可用於治療或預防與ActRIIB多肽及/或ActRIIB配位體（例如GDF8）之異常活性相關之疾病或病狀。此等疾病、病症或病狀於本文中一般稱作「ActRIIB相關病狀」。在某些具體實例中，本發明提供經由將治療有效量之如上所述ActRIIB多肽投予有需要之個體來治療或預防該個體之方法。此等方法尤其針對動物且更特定言之人類之治療性及預防性治療。

【0109】 如本文所用之「預防」病症或病狀之治療劑係指在統計樣本中，相對於未經治療之對照樣本減少經治療樣本之病症或病狀的發生或相對於未經治療之對照樣本延緩病症或病狀之一或多種症狀之發作或降低病症或病狀之一或多種症狀之嚴重性的化合物。如本文所用之術語「治療」包括預防指定病狀或一旦病狀已確立即改善或消除該病狀。

【0110】 ActRIIB/ActRIIB配位體複合物在組織生長以及諸如各種結構正確形成之早期發育過程中或在一或多種包括性發育、垂體激素產生及骨及軟骨形成之發育後能力中起基本作用。因此，ActRIIB相關病狀包括異常組織生長及發育缺陷。另外，ActRIIB相關病狀包括（但不限於）：細胞生長及分化之病症，諸如炎症、過敏症、自體免疫疾病、傳染病及腫瘤。

【0111】 例示性ActRIIB相關病狀包括神經肌肉病症（例如肌肉營養不良及肌肉萎縮症）、充血性阻塞性肺病（及與COPD相關之肌肉消瘦）、肌肉消瘦症候群、肌肉減少症、惡病質、脂肪組織病症（例如肥胖症）、2型糖尿病及骨骼退化性疾病（例如骨質疏鬆症）。其他例示性ActRIIB相關病狀包括肌肉退化及神經肌肉病症、組織修復（例如傷口復原）、神經退化性疾病（例如肌肉萎縮性側索硬化）、免疫病症（例如與淋巴細胞之異常增殖或功能相關之病症）及肥胖症或與脂肪細胞之異常增殖相關之病症。

【0112】 在某些具體實例中，本發明之組合物（例如可溶性ActRIIB多

肽) 用作肌肉營養不良之治療的一部分。術語「肌肉營養不良」係指特徵在於骨骼肌及有時心肌及呼吸肌逐漸衰弱及惡化之退化性肌肉疾病之群。肌肉營養不良為特徵在於以肌肉中之微觀變化起始之進行性肌肉消瘦及衰弱的遺傳病症。當肌肉隨時間退化時，人體之肌肉強度下降。可用包括主題ActRIIB多肽之方案治療之例示性肌肉營養不良包括：杜興氏肌肉營養不良（DMD）、貝克氏肌肉營養不良（Becker Muscular Dystrophy，BMD）、艾-德氏肌肉營養不良（Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy，EDMD）、肢帶型肌肉營養不良（LGMD）、面肩肱型肌肉營養不良（FSH或FSHD）（亦稱為蘭-德氏（Landouzy-Dejerine））、肌強直性營養不良（MMD）（亦稱為斯泰奈特氏病（Steinert's Disease））、眼咽型肌肉營養不良（OPMD）、遠端型肌肉營養不良（DD）、先天性肌肉營養不良（CMD）。

【0113】 杜興氏肌肉營養不良（DMD）首先由法國神經學者Guillaume Benjamin Amand Duchenne於19世紀60年代描述。貝克氏肌肉營養不良（BMD）係以德國醫生Peter Emil Becker命名，其於20世紀50年代首先描述此DMD變體。DMD為男性中最為頻繁之遺傳性疾病之一，其影響1/3,500名男子。當位於X染色體之短臂上之肌縮蛋白基因遭破壞時DMD發生。由於男性僅帶有X染色體之一個複本，因此其僅具有肌縮蛋白基因之一個複本。在無肌縮蛋白之情況下，肌肉在收縮及鬆弛之循環期間易受損。儘管在疾病早期肌肉由再生補償，但稍後肌肉祖細胞趕不上進行中之損傷且健康肌肉由非功能性纖維脂肪組織置換。

【0114】 BMD由肌縮蛋白基因之不同突變引起。BMD患者具有一些肌縮蛋白，但其量不足或品質較差。具有一些肌縮蛋白保護患有BMD之彼等者之肌肉免於與患有DMD之人的肌肉一般惡劣或快速地退化。

【0115】 舉例而言，新近研究證實阻斷或消除活體內GDF8（ActRIIB配

位體)之功能可有效治療DMD及BMD患者之至少某些症狀。因此，主題ActRIIB多肽可充當GDF8抑制劑(拮抗劑)，且構成阻斷DMD及BMD患者之活體內GDF8及/或ActRIIB之功能的替代方式。此方法由本文所示之資料確認並支持，藉以顯示ActRIIB-Fc蛋白增加肌肉營養不良之小鼠模型之肌肉質量。

【0116】 類似地，主題ActRIIB多肽提供增加需要肌肉生長之其他疾病病狀之肌肉質量的有效方式。舉例而言，ALS，亦稱為路葛雷克氏病(Lou Gehrig's disease)(運動神經元疾病)，為攻擊運動神經元(將腦與骨骼肌連接之CNS組份)之慢性、不可治癒及不可停止之CNS病症。在ALS中，運動神經元惡化且最終死亡，且儘管人腦通常保持完全功能性及警覺性，但運動之指令從未到達肌肉。患有ALS之多數人介於40歲與70歲之間。衰弱之首批運動神經元為通向臂及腿之彼等運動神經元。患有ALS之彼等者可能具有行走困難，其可能摔落物品、跌倒、口齒不清及哭或笑無法控制。最後，四肢之肌肉開始因廢棄不用而萎縮。此肌肉衰弱將變得使人虛弱無力且人將需要輪椅或變得不能下床活動。自疾病發作3-5年，多數ALS患者死於呼吸衰竭或死於呼吸器協助之併發症(如肺炎)。此方法由本文所示之資料確認並支持，藉以顯示ActRIIB-Fc蛋白改良ALS之小鼠模型之外貌、肌肉質量及壽命。

【0117】 ActRIIB多肽誘導之肌肉質量增加可能亦有益於罹患肌肉消瘦疾病之彼等者。Gonzalez-Cadavid等人(同上)報導彼GDF8表現與人類之去脂肪質量反向相關且GDF8基因之表現增加與患有AIDS消瘦症候群之人的減重相關。藉由抑制GDF8在AIDS患者中之功能，AIDS之至少某些症狀可得以減輕(若未完全消除)，由此顯著改良AIDS患者之生命品質。

【0118】 由於GDF8(ActRIIB配位體)功能之損失亦與脂肪流失相關而不減少營養攝取(Zimmers等人, 同上; McPherron及Lee, 同上)，因此主題ActRIIB多肽可進一步用作減緩或防止肥胖症及II型糖尿病發展之治療劑。此方

法由本文所示之資料確認並支持，藉以顯示ActRIIB-Fc蛋白改良肥胖小鼠之代謝狀況。

【0119】 癌症厭食-惡病質症候群為癌症之最虛弱性及威脅生命性方面之一。癌症厭食-惡病質症候群之進行性減重為許多類型之癌症的常見特徵且不僅為造成不良生命品質及對化學療法之不良反應性的原因，而且為造成比具有相當腫瘤而無減重之患者中所發現之存活時間更短之存活時間的原因。與厭食、脂肪及肌肉組織消瘦、心理痛苦及較低生命品質相關，惡病質由癌症與宿主之間的複雜相互作用引起。其為癌症患者當中死亡之最常見原因之一且存在於80%死亡中。其為影響蛋白質、碳水化合物及脂肪代謝之代謝混亂的複雜實例。腫瘤產生直接與間接異常，從而導致厭食及減重。當前，不存在控制或逆轉該過程之治療。癌症厭食-惡病質症候群影響細胞激素產生、脂質動員因子及蛋白水解誘導因子之釋放及中間代謝變化。儘管厭食為常見的，但單獨食物攝取減少不能成為癌症患者中所見之體組成變化的原因，且增加營養攝取不能逆轉消瘦症候群。若在六個月時段內發生大於病前重量之5%之非自主減重，則應懷疑患有癌症之患者存在惡病質。

【0120】 由於發現GDF8於成年小鼠中之全身性過度表現誘發類似於人類惡病質症候群中所見之顯著肌肉及脂肪流失（Zimmers等人,同上），因此呈醫藥組合物形式之主題ActRIIB多肽可有益地用於預防、治療或減輕需要肌肉生長之惡病質症候群之症狀。

【0121】 在其他具體實例中，本發明提供誘導骨及/或軟骨形成、預防骨質流失、增加骨礦化或預防骨脫礦質之方法。舉例而言，主題ActRIIB多肽及本發明所鑑別之化合物在治療人類及其他動物之骨質疏鬆症及使人類及其他動物之骨折及軟骨缺陷復原方面具有應用。ActRIIB多肽可在經診斷具有亞臨床低骨密度之患者中適用作針對骨質疏鬆症發展之保護性量測。

【0122】 在一特定具體實例中，本發明之方法及組合物可在使人類及其他動物之骨折及軟骨缺陷復原方面具有醫學效用。主題方法及組合物亦可在閉合性以及開放性骨折復位方面以及人工關節之改良固定方面具有預防性用途。由成骨劑誘導之重新骨形成促成先天性、外傷誘發或腫瘤切除誘發之顱面缺陷的修復，且亦適用於整形美容外科。另外，本發明之方法及組合物可用於治療牙周病，且可用於其他牙齒修復過程。在某些狀況下，主題ActRIIB多肽可提供吸引骨形成細胞、刺激骨形成細胞生長或誘導骨形成細胞之祖細胞分化的環境。本發明之ActRIIB多肽亦可適用於治療骨質疏鬆症。另外，ActRIIB多肽可用於軟骨缺陷修復及骨關節炎的預防/逆轉。

【0123】 在另一特定具體實例中，本發明提供修復骨折及與軟骨及/或骨缺陷相關之其他病狀或牙周病之治療方法及組合物。本發明進一步提供傷口復原及組織修復之治療方法及組合物。傷口類型包括（但不限於）：燒傷、切口及潰瘍。參見，例如PCT公開案第WO84/01106號。該等組合物包含治療有效量之與醫藥學上可接受之媒劑、載劑或基質混合之至少一種本發明ActRIIB多肽。

【0124】 在另一特定具體實例中，本發明之方法及組合物可應用於引起骨質流失之病狀，該等病狀諸如骨質疏鬆症、副甲狀腺高能症、庫欣氏病（Cushing's disease）、甲狀腺毒症、慢性腹瀉病況或吸收障礙、腎小管性酸中毒或神經性厭食。許多人瞭解，作為女性，具有體重輕及經歷久坐生活方式為骨質疏鬆症之危險因素（骨礦物密度流失，導致骨折危險）。然而，骨質疏鬆症亦可由長期使用某些藥物引起。由藥物或另一醫學病況引起之骨質疏鬆症稱為繼發性骨質疏鬆症。在稱為庫欣氏病之病狀中，由身體產生之過量皮質醇導致骨質疏鬆症及骨折。與繼發性骨質疏鬆症相關之最常見藥物為皮質類固醇，其為一類作用類似於皮質醇（一種由腎上腺天然產生之激素）之藥物。儘管足

夠水平之甲狀腺激素（其由甲狀腺產生）為骨骼發育所需，但過量甲狀腺激素可使骨質量隨時間減少。含有鋁之抗酸劑當以高劑量由具有腎問題之人，尤其彼等經歷透析之人服用時可導致骨質流失。可引起繼發性骨質疏鬆症之其他藥物包括：苯妥英（phenytoin）（Dilantin）及巴比妥酸鹽（barbiturate），其用於預防猝發；甲胺喋呤（methotrexate）（Rheumatrex, Immunex, Folex PFS），一種用於一些形式之關節炎、癌症及免疫病症之藥物；環孢黴素（cyclosporine）（Sandimmune, Neoral），一種用於治療一些自體免疫疾病及抑制器官移植患者之免疫系統的藥物；促黃體激素釋放之激素促效劑（Lupron, Zoladex），其用於治療前列腺癌及子宮內膜異位；肝素（Calciparine, Liquaemin），一種抗凝藥物；及消膽胺（cholestyramine）（Questran）及考來替潑（colestipol）（Colestid），其用於治療高膽固醇。齒齦病引起骨質流失，此係由於吾人口腔中之此等有害細菌促使吾人身體防衛該等細菌。細菌在齒齦線下產生毒素及酶，從而引起慢性感染。

【0125】 在又一具體實例中，本發明提供治療與異常或不合需要之骨生長相關之疾病或病症的方法及治療劑。舉例而言，患有稱為進行性骨化纖維發育不良（FOP）之疾病的患者長出阻止任何運動之異常「第二骨骼」。另外，異常骨生長可在髖置換手術後發生且由此毀滅手術成果。此為病態骨生長之更常見實例及主題方法及組合物可在治療學上適用之情況。相同方法及組合物亦可適用於治療其他形式之異常骨生長（例如外傷、燒傷或脊髓損傷後骨骼之病態生長），且適用於治療或預防與關於轉移性前列腺癌或骨肉瘤所見之異常骨生長相關之不合需要病狀。此等治療劑之實例包括（但不限於）：拮抗ActRIIB配位體（例如BMP7）功能之ActRIIB多肽、破壞ActRIIB與其配位體（例如BMP7）之間的相互作用之化合物，及與ActRIIB受體特異性結合使得ActRIIB配位體（例如BMP7）不能與該ActRIIB受體結合之抗體。

【0126】 在其他具體實例中，本發明提供調節動物之體脂肪含量及治療或預防與其相關之病症，及尤其與其相關之健康受損病狀的組合物及方法。根據本發明，調節（控制）體重可指代減輕或增加體重、減小或增加增重速率，或增加或減小減重速率，且亦包括主動維持體重或不顯著改變體重（例如，針對可以其他方式增加或減輕體重之外部或內部影響）。本發明之一具體實例係關於藉由將ActRIIB多肽投予有需要之動物（例如人類）來調節體重。

【0127】 在一特定具體實例中，本發明係關於減輕動物之體重及/或減少動物之增重，及更特定言之治療或改善處於肥胖症危險中或罹患肥胖症之患者之肥胖症的方法及化合物。在另一特定具體實例中，本發明係針對治療不能增加或保持體重之動物（例如，患有消瘦症候群之動物）之方法及化合物。該等方法有效增加身體重量及/或質量，或減小重量及/或質量流失，或改良與不合需要之低（例如不健康）身體重量及/或質量相關或由不合需要之低（例如不健康）身體重量及/或質量引起之病狀。

7.醫藥組合物

【0128】 在某些具體實例中，將本發明之化合物（例如ActRIIB多肽）與醫藥學上可接受之載劑一起調配。舉例而言，可單獨或作為醫藥調配物（治療組合物）之組份投予ActRIIB多肽。主題化合物可經調配用於以任何便利方式投藥以在人類或獸醫醫學中使用。

【0129】 在某些具體實例中，本發明之治療方法包括以植入物或裝置之形式表面、全身或局部投予組合物。當投予時，用於本發明之治療組合物當然係呈無熱原質、生理學上可接受之形式。另外，該組合物可理想地囊封或注射於黏性形式中以供傳遞至目標組織部位（例如，骨、軟骨、肌肉、脂肪或神經元），例如具有組織損傷之部位。局部投藥可適用於傷口復原及組織修復。亦可視情況包括於如上所述之組合物中之不同於ActRIIB多肽的治療學上適用之

藥劑可其他或另外在本發明之方法中與主題化合物（例如ActRIIB多肽）同時或相繼投予。

【0130】 在某些具體實例中，本發明之組合物可包括能將一或多種治療化合物（例如ActRIIB多肽）傳遞至目標組織部位、提供使組織發育之結構且最佳能被再吸收至體內之基質。舉例而言，該基質可提供ActRIIB多肽的緩慢釋放。該等基質可由目前用於其他植入式醫學應用之材料形成。

【0131】 基質材料之選擇係基於生物相容性、生物降解性、機械特性、美容外觀及界面特性。主題組合物之特定應用將界定適當調配物。供組合物用之潛在基質可為生物可降解且經化學定義之硫酸鈣、磷酸三鈣、羥磷灰石、聚乳酸及聚酸酐。其他潛在材料為生物可降解的且經生物學上充分定義，諸如骨膠原蛋白或真皮膠原蛋白。其他基質包含純蛋白質或細胞外基質組份。其他潛在基質為非生物可降解的且經化學定義，諸如燒結羥磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽或其他陶瓷。基質可包含任何上文所提及類型之材料的組合，諸如聚乳酸與羥磷灰石或膠原蛋白與磷酸三鈣。生物陶瓷在組成（諸如鈣-鋁酸鹽-磷酸鹽）及加工方面可改變以改變孔徑、粒度、粒子形狀及生物降解性。

【0132】 在某些具體實例中，可施以本發明之方法以供口服，例如呈膠囊、扁膠劑、丸劑、錠劑、口含劑（使用調味基質，通常為蔗糖及阿拉伯膠（acacia）或黃耆膠）、散劑、顆粒之形式，或作為於水性或非水性液體中之溶液或懸浮液，或作為水包油或油包水液體乳液，或作為酏劑或糖漿，或作為片劑（使用惰性基質，諸如明膠及甘油，或蔗糖及阿拉伯膠）及/或作為漱口水及類似物，其各含有預定量之藥劑作為活性成份。藥劑亦可以大丸劑、舐劑或糊劑之形式投予。

【0133】 在供經口投予之固體劑型（膠囊、錠劑、丸劑、糖衣藥丸、散劑、顆粒及類似物）中，可將本發明之一或多種治療化合物與一或多種醫藥學

上可接受之載劑（諸如檸檬酸鈉或磷酸二鈣）及/或以下物質中之任一者混合：

（1）填充劑或增補劑，諸如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇及/或矽酸；（2）黏合劑，諸如羧甲基纖維素、褐藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖及/或阿拉伯膠；（3）保濕劑，諸如甘油；（4）崩解劑，諸如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、褐藻酸、某些矽酸鹽及碳酸鈉；（5）溶液阻滯劑，諸如石蠟；（6）吸收促進劑，諸如四級銨化合物；（7）濕潤劑，諸如十六烷醇及甘油單硬脂酸酯；（8）吸收劑，諸如高嶺土（kaolin）及膨潤土；（9）潤滑劑，諸如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、十二烷基硫酸鈉及其混合物；及（10）著色劑。在膠囊、錠劑及丸劑之狀況下，醫藥組合物亦可包含緩衝劑。類似類型之固體組合物亦可用作使用諸如乳糖以及高分子量聚乙二醇及類似物之賦形劑之軟性及硬性填充明膠膠囊中的填充劑。

【0134】 供經口投予之液體劑型包括醫藥學上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酏劑。除活性成份以外，液體劑型可含有此項技術中常用之惰性稀釋劑，諸如水或其他溶劑；增溶劑及乳化劑，諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苧醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油（尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油）、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇，及脫水山梨糖醇之脂肪酸酯；及其混合物。除惰性稀釋劑以外，口服組合物亦可包括佐劑，諸如濕潤劑、乳化劑及懸浮劑、甜味劑、調味劑、著色劑、芳香劑及防腐劑。

【0135】 除活性化合物以外，懸浮液可含有懸浮劑（諸如乙氧基化異十八烷醇、聚氧化乙烯山梨糖醇及脫水山梨糖醇酯）、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃耆膠及其混合物。

【0136】 可將本文所揭示之某些組合物局部投予皮膚或黏膜。局部調配物可進一步包括已知有效作為皮膚或角質層穿透增強劑之多種試劑中之一或多

者。此等試劑之實例為2-吡咯啉酮、N-甲基-2-吡咯啉酮、二甲基乙醯胺、二甲基甲醯胺、丙二醇、甲醇或異丙純、二甲亞砷及氮酮。可進一步包括其他試劑以製成美容學上可接受之調配物。此等試劑之實例為脂肪、蠟、油、染料、芳香劑、防腐劑、穩定劑及表面活性劑。亦可包括去角質劑，諸如此項技術中已知之彼等去角質劑。實例為水楊酸及硫。

【0137】 供局部或經皮投予之劑型包括散劑、噴霧、軟膏、糊劑、乳膏、洗劑、凝膠、溶液、貼片及吸入劑。可在無菌條件下將活性化合物與醫藥學上可接受之載劑及與可能需要之任何防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。軟膏、糊劑、乳膏及凝膠除本發明之主題化合物（例如ActRIIB多肽）以外可含有賦形劑，諸如動物及植物脂肪、油、蠟、石蠟、澱粉、黃耆膠、纖維素衍生物、聚乙二醇、聚矽氧、膨潤土、矽酸、滑石及氧化鋅或其混合物。

【0138】 散劑及噴霧除主題化合物以外可含有賦形劑，諸如乳糖、滑石、矽酸、氫氧化鋁、矽酸鈣及聚醯胺粉末或此等物質之混合物。噴霧可另外含有習用推進劑，諸如氯氟烴及揮發性未經取代烴（諸如丁烷及丙烷）。

【0139】 在某些具體實例中，適合於非經腸投藥之醫藥組合物可包含一或多種ActRIIB多肽與一或多種醫藥學上可接受之無菌等張水溶液或非水溶液、分散液、懸浮液或乳液，或可在臨用前復水成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末的組合，該等醫藥組合物可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、促使調配物與所欲接受者之血液等張的溶質，或懸浮劑或增稠劑。可在本發明之醫藥組合物中使用之合適水性載劑及非水載劑之實例包括水、乙醇、多元醇（諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及類似多元醇）及其合適之混合物、植物油（諸如橄欖油）及可注射之有機酯（諸如油酸乙酯）。可（例如）藉由使用塗層物質（諸如卵磷脂）、在分散液之狀況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。

【0140】 本發明之組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由包括例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及類似物之各種抗細菌劑及抗真菌劑來確保防止微生物作用。亦可能需要將諸如糖、氯化鈉及類似物之等張劑包括於組合物中。另外，可藉由包括延緩吸收之試劑（諸如單硬脂酸鋁及明膠）來促成可注射醫藥形式之延長吸收。

【0141】 應瞭解給藥方案將由主治醫師在考慮改變本發明之主題化合物（例如ActRIIB多肽）之作用的各種因素下確定。各種因素將視待治療之疾病而定。在肌肉病症之狀況下，因素可包括（但不限於）：欲有待形成之肌肉質量的量，最受疾病影響之肌肉，惡化肌肉之病狀，患者之年齡、性別及膳食，投藥時間，及其他臨床因素。將其他已知之生長因子添加至最終組合物中亦可影響劑量。可由肌肉生長及/或修復的週期性評估，例如由強度測試、肌肉尺寸之MRI評估及肌肉活組織檢查之分析來監測進程。

【0142】 在本發明之某些具體實例中，可一起（同時）或在不同時間（相繼或重疊）投予一或多種ActRIIB多肽。另外，可將ActRIIB多肽與例如軟骨誘導劑、骨誘導劑、肌肉誘導劑、脂肪減少劑或神經元誘導劑之另一類型治療劑一起投予。可同時或在不同時間投予兩種類型之化合物。預期本發明之ActRIIB多肽可與另一治療劑協作或可能與其協同起作用。

【0143】 在一特定實例中，已描述多種成骨因子、軟骨誘導因子及骨誘導因子，尤其雙膦酸鹽。參見，例如歐洲專利申請案第148,155號及第169,016號。舉例而言，可與主題ActRIIB多肽組合之其他因子包括多種生長因子，諸如表皮生長因子（EGF）、衍生自血小板之生長因子（PDGF）、轉型生長因子（TGF- α 及TGF- β ），及類胰島素生長因子（IGF）。

【0144】 在某些具體實例中，本發明亦提供活體內產生ActRIIB多肽之基因療法。該療法會藉由將ActRIIB聚核苷酸序列引入患有如上所列之病症的細

胞或組織中來達成其治療作用。ActRIIB聚核苷酸序列的傳遞可使用重組性表現載體（諸如嵌合病毒）或膠狀分散系統來達成。對ActRIIB聚核苷酸序列之治療性傳遞而言較佳為使用所靶向之脂質體。

【0145】 可用於如本文所教示之基因療法的各種病毒載體包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘或較佳RNA病毒（諸如反轉錄病毒）。較佳地，反轉錄病毒載體為鼠類或鳥類反轉錄病毒之衍生物。可插有單一外來基因之反轉錄病毒載體之實例包括（但不限於）：莫洛尼鼠類白血病毒（Moloney murine leukemia virus, MoMuLV）、哈維鼠類肉瘤病毒（Harvey murine sarcoma virus, HaMuSV）、鼠類乳腺腫瘤病毒（MuMTV）及勞氏肉瘤病毒（Rous Sarcoma Virus, RSV）。許多其他反轉錄病毒載體可合併多個基因。所有此等載體可轉移或合併可選擇標記之基因使得經轉導之細胞可得以鑑別及產生。反轉錄病毒載體可藉由附著（例如）糖、糖脂或蛋白質而製成對靶具特異性。較佳之靶向係藉由使用抗體來實現。熟習此項技術者應瞭解，可將特定聚核苷酸序列插入反轉錄病毒基因組中或與病毒包膜連接以允許靶特異性傳遞含有ActRIIB聚核苷酸之反轉錄病毒載體。在一較佳具體實例中，將載體靶向骨、軟骨、肌肉或神經元細胞/組織。

【0146】 或者，可由習知磷酸鈣轉染法將組織培養細胞直接用編碼反轉錄病毒結構基因gag、pol及env之質體轉染。接著將此等細胞用含有受關注基因之載體質體轉染。所得細胞將反轉錄病毒載體釋放至培養基中。

【0147】 ActRIIB聚核苷酸之另一靶向傳遞系統為膠狀分散系統。膠狀分散系統包括巨分子複合物，奈米膠囊，微球體，珠粒，及包括水包油乳液、微胞、混合型微胞及脂質體之脂質基系統。本發明之較佳膠狀系統為脂質體。脂質體為適用作試管內及活體內傳遞媒劑之人工膜囊。可將RNA、DNA及完整病毒粒子囊封於水性內部中且以生物活性形式傳遞至細胞（參見，例如Fraley等

人，Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981）。使用脂質體媒劑進行有效基因轉移之方法在此項技術中已知，參見，例如Mannino等人，Biotechniques, 6:682, 1988。脂質體之組成通常為常與類固醇、尤其膽固醇組合之磷脂的組合。亦可使用其他磷脂或其他脂質。脂質體之物理特徵視pH值、離子強度及二價陽離子的存在而定。

【0148】 適用於產生脂質體之脂質的實例包括磷脂醯化合物，諸如磷脂醯甘油、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、鞘脂、腦甘脂及神經節苷脂。說明性磷脂包括卵磷脂醯膽鹼、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼及二硬脂醯磷脂醯膽鹼。脂質體之靶向亦有可能基於（例如）器官特異性、細胞特異性及細胞器特異性且在此項技術中已知。

例示

【0149】 本發明現正加以一般性描述，藉由參考以下實施例將更易於理解本發明，該等實施例僅出於說明某些具體實例及本發明之具體實例之目的而包括在內且並不意欲限制本發明。

實施例1.ActRIIB突變體的產生

【0150】 申請者在ActRIIB之胞外域中產生一系列突變且在細胞外ActRIIB與Fc域之間產生呈可溶性融合蛋白形式之此等突變蛋白。背景ActRIIB-Fc融合體具有以下序列（Fc部分加下劃線）（SEQ ID NO: 14）：

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTI
ELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG
PEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0151】 將多種突變引入背景ActRIIB-Fc蛋白中。由PCR突變在ActRIIB胞外域中產生突變。繼PCR之後，將片段經Qiagen管柱純化，用SfoI及AgeI消化且經凝膠純化。將此等片段接合至表現載體pAID4中使得在接合後其即與人類IgG1形成融合嵌合體。轉型至大腸桿菌DH5 α 中之後，採集菌落且分離DNA。所有突變體皆經序列驗證。

【0152】 在HEK293T細胞中藉由瞬間轉染產生所有突變體。

【0153】 總而言之，在500 ml旋轉器中，在250 ml體積之Freestyle (Invitrogen) 培養基中以 6×10^5 個細胞/毫升設定HEK293T細胞且使其生長隔夜。第二天，以0.5 μ g/ml最終DNA濃度將此等細胞用DNA:PEI (1:1) 複合物處理。4小時後，添加250 ml培養基且使細胞生長7天。藉由旋轉細胞使其下降來收集經調節之培養基且將其濃縮。

【0154】 經蛋白質A管柱純化突變體且用低pH值 (3.0) 甘胺酸緩衝液溶離。中和後，針對PBS透析此等物質。

【0155】 亦由類似方法在CHO細胞中產生突變體。

【0156】 在結合檢定及/或下述生物檢定中測試突變體。於CHO細胞及HEK293細胞中表現之蛋白質在結合檢定及生物檢定中不可區分。在一些情況下，以經調節之培養基而非經純化之蛋白質來進行檢定。

實施例2.GDF-11及活化素介導之信號轉導的生物檢定

【0157】 A-204報導體基因檢定用於評估ActRIIB-Fc蛋白對由GDF-11及活化素A信號轉導的影響。細胞系：人橫紋肌肉瘤（衍生自肌肉）。報導體載體：pGL3(CAGA)12 (以SEQ ID NO: 15揭示之(CAGA)12)（描述於Dennler等人, 1998, EMBO 17: 3091-3100中）。參見圖5。CAGA12基元 (SEQ ID NO: 15)存在於TGF- β 反應基因 (PAI-1基因) 中，故此載體一般用於經Smad2及3進行因子信

號轉導。

【0158】 第1天：使A-204細胞分裂至48孔盤中。

【0159】 第2天：將A-204細胞用10 µg pGL3(CAGA)12 (以SEQ ID NO: 15揭示之(CAGA)12)或pGL3(CAGA)12 (以SEQ ID NO: 15揭示之(CAGA)12) (10 µg) +pRLCMV (1 µg) 及Fugene轉染。

【0160】 第3天：添加因子（稀釋至培養基+0.1% BSA中）。添加至細胞中前，抑制劑須與因子一起預培育1小時。6小時後，用PBS沖洗細胞，且將細胞溶解。

【0161】 此後進行螢光素酶檢定。在不存在任何抑制劑下，活化素A顯示10倍刺激報導體基因表現且ED50約2 ng/ml。GDF-11：16倍刺激，ED50：約1.5 ng/ml。

【0162】 如圖16所示，ActRIIB(A64 20-119)-Fc在A-204報導體基因檢定中抑制GDF-11信號轉導。背景A64構築體對GDF-11活性顯示抑制作用。ActRIIB(R64, 20-119)-Fc形式引起GDF-11抑制的實質性抑制；且R64形式與添加胞外域之15個C末端胺基酸（15個胺基酸「尾巴」）之組合，ActRIIB(R64 20-134)，產生甚至更有效之GDF-11活性抑制劑。如圖17所示，背景A64構築體對活化素A活性顯示抑制作用。K74A突變引起活化素A抑制的實質性增加。缺乏活化素A之對照樣本顯示無活性。

【0163】 設計一系列突變體且在此檢定中測試。

實施例3.GDF-11抑制

【0164】 如上所述，在基於細胞之檢定中測試ActRIIB-Fc蛋白之活性。結果概述於下表1中。顯著地，L79D及L79E變體顯示活化素結合的實質性損失，同時近乎保持GDF-11之野生型抑制。

表1：可溶性ActRIIB-Fc與GDF11及活化素A結合

ActRIIB-Fc 變化	ActRIIB之部分 (對應於SEQ ID NO: 4之胺基酸)	GDF11抑制活性	活化素抑制活性
64R	20-134	+++ (約 10^{-8} M K_I)	+++ (約 10^{-8} M K_I)
64A	20-134	+ (約 10^{-6} M K_I)	+ (約 10^{-6} M K_I)
64R	20-119	++	++
64R	20-129	+++	+++
64R K74A	20-134	++++	++++
64R K74A	20-119	+	+
64R A24N	20-134	+++	+++
64R A24N	20-119	++	++
64R A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

- + 弱活性 (約 1×10^{-6} K_I)
- ++ 中等活性 (約 1×10^{-7} K_I)
- +++ 良好 (野生型) 活性 (約 1×10^{-8} K_I)
- ++++ 高於野生型活性

【0165】 已針對大鼠中之血清半衰期來評估若干變體。ActRIIB(R64 20-134)-Fc具有約70小時之血清半衰期。ActRIIB(R64 A24N 20-134)-Fc具有約100-

150小時之血清半衰期。顯著地，在位置79處引入酸性胺酸（天冬胺酸或麩胺酸）選擇性地降低活化素結合性，同時保持GDF11結合性。如下文所討論，野生型ActRIIB-Fc蛋白似乎對除肌肉以外之組織有影響，其中有一些影響可為不合需要的。如本文所揭示，預期此等影響與由ActRIIB-Fc結合並抑制之各種不同配位體（包括，可能活化素）相關。初始資料指示，在小鼠中，L79E及L79D變體對除肌肉以外之組織具有降低之影響，同時保持其對肌肉的影響。儘管此類型之變化可被視為ActRIIB之變體，但應注意，此等蛋白質不再真正充當活化素受體，且由此名稱「ActRIIB」僅適用作此等多肽之衍生的指示。儘管位置79處之酸性殘基降低活化素結合性同時保持GDF11結合性，但此位置處之其他變化並不具有此作用。L79A變化使活化素結合性相對於GDF11結合性增加。L79P變化使活化素結合性與GDF11結合性均降低。

實施例4.GDF-11及活化素A結合性

【0166】 在BiaCore™檢定中測試某些ActRIIB-Fc蛋白之結合性。

【0167】 使用標準胺偶合程序將GDF-11或活化素A（「ActA」）固定於Biacore CM5晶片上。將ActRIIB-Fc突變體或野生型蛋白質負載於系統上，且量測結合性。結果概述於下表2中。

表2：可溶性ActRIIB-Fc與GDF11及活化素A結合（BiaCore檢定）

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15尾巴	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* 無所觀測之結合

-- < 1/5 WT結合

- 約1/2 WT結合

+ WT

++ < 2倍結合增加

+++ 約5倍結合增加

++++ 約10倍結合增加

+++++ 約40倍結合增加

【0168】 如表2所示，突變對配位體結合具有不同影響。胞外域之C末端15個胺基酸的添加使得對活化素A與GDF-11之結合親和力均實質性增加，且預期此影響將體現至基本上所有其他突變。其他突變使得配位體結合親和力總體增加，該等突變包括天然產生之等位基因A64R及K74A。R40A突變使得對活化素A與GDF-11之結合親和力均中等降低。許多突變消除與活化素A及GDF-11之可偵測性結合，該等突變包括：E37A、R56A、W78A、D80K、D80R、D80A、D80G、D80F、D80M及D80N。某些突變引起選擇性轉移。以下突變使得GDF-11結合性與活化素A結合性之比率增加：K74Y、K74F、K74I及D80I。以下突變使得GDF-11結合性與活化素A結合性之比率減小：D54A、K55A、L79A及F82A。

實施例5：ActRIIB-Fc蛋白對野生型小鼠之肌肉質量的影響

【0169】 申請者測定ActRIIB-Fc蛋白增加野生型小鼠之肌肉質量的能力。

【0170】 每週兩次用人類ActRIIB (R64 20-134)蛋白或人類ActRIIB (K74A 20-134)對C57Bl10小鼠給藥（10 mg/kg；經腹膜內（i.p.））。第0天及第28天對小鼠進行NMR掃描以測定全身瘦肉組織質量的變化百分數。經人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc治療之小鼠當與媒劑對照組相比時顯示瘦肉組織顯著增加31.1%。經人類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc蛋白治療之小鼠與對照組相比顯示瘦肉組織質量增加的顯著增加，儘管其程度低於人類ActRIIB (R64 20-134)治療組。在類似研究中，每週兩次用PBS，1 mg/kg、3 mg/kg或10 mg/kg鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc經腹膜內治療小鼠。研究結束時，將股肌、腓腸肌、胸肌及膈肌剖切並稱重。結果概述於下表3中。

表3：來自經媒劑治療及經鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療之野生型小鼠的組織重量

經媒劑治療	腓腸肌 (L+R)	股肌 (L+R)	胸肌 (L+R)	膈肌
平均值（公克）±標準差	0.306 ± 0.020	0.187 ± 0.040	0.257 ± 0.020	0.076 ± 0.020
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	腓腸肌 (L+R)	股肌 (L+R)	胸肌 (L+R)	膈肌
平均值（公克）±標準差	0.387 ± 0.010	0.241 ± 0.014	0.360 ± 0.070	0.124 ± 0.040
T 測試 p 值	0.0001	0.009	0.02	0.04

【0171】 如表3所示，鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc融合蛋白顯著增加野生型小鼠之肌肉質量。在經鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療之小鼠中，腓腸肌增加26.5%，股肌增加28.9%，胸肌增加40.0%。吾人亦觀測到膈肌之變化，其與經媒劑治療之對照小鼠相比增加63%。膈肌減少為多種肌肉營養不良中之常見併發症。因此，鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療後所見之膈肌重量增加可具臨床重要性。

實施例6：ActRIIB-Fc蛋白對Mdx小鼠之肌肉質量及強度的影響

【0172】 為測定鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc蛋白增加疾病病狀之肌肉質量的能力，申請者測定ActRIIB-Fc蛋白增加肌肉營養不良之mdx小鼠模型之肌肉質量的能力。

【0173】 每週兩次用鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc蛋白（1、3或10 mg/kg；經腹膜內）或PBS媒劑對照治療mdx小鼠。量測小鼠當牽拉力傳感器時

所施加之力以測定前肢握緊強度。5次牽拉試驗之平均力用於組間之握緊強度比較。研究結束時，將股肌、腓腸肌、胸肌及膈肌剖切並稱重。圖18展示握緊強度量測。肌肉質量結果概述於下表4中。

表4：來自經媒劑治療及經鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療之mdx小鼠的組織重量

經媒劑治療	腓腸肌 (L+R)	股肌 (L+R)	胸肌 (L+R)	膈肌
平均值（公克）±標準差	0.413 ± 0.040	0.296 ± 0.019	0.437 ± 0.060	0.111 ± 0.030
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	腓腸肌 (L+R)	股肌 (L+R)	胸肌 (L+R)	膈肌
平均值（公克）±標準差	0.52 ± 0.050	0.39 ± 0.05	0.807 ± 0.21	0.149 ± 0.020
T 測試 p 值	0.0006	0.0006	0.002	0.05

【0174】 如表4所說明，經鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療之組與經PBS治療之小鼠相比顯示mdx小鼠之瘦肉組織質量增加。ActRIIB-Fc治療與媒劑對照組相比使腓腸肌尺寸增加25.9%，股肌尺寸增加31.8%且胸肌增加85.4%。具可能的臨床重要性，吾人亦發現經小鼠ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療之小鼠的膈肌重量與對照組相比增加34.2%。此等數據證實ActRIIB-Fc蛋白在肌肉營養不良疾病病狀中之功效。

【0175】 另外，圖18展示經ActRIIB-Fc蛋白治療之mdx小鼠與經媒劑治療之對照相比顯示握緊強度增加。在16週時，1、3及10 mg/kg ActRIIB組與媒劑對照組相比顯示握緊強度分別增加31.4%、32.3%及64.4%。經鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療之組的改良握緊強度效能支持治療組中所發現之肌肉增加具有生理學相關性之觀點。mdx小鼠易受收縮誘導性損傷且比其野生型對應物經歷

顯著更多之退化及再生循環。儘管此等肌肉表型如此，但鼠類ActRIIB (WT, 20-134)-Fc治療增加*mdx*小鼠之握緊強度。

實施例7：ActRIIB-Fc蛋白對SOD1小鼠之強度及存活性的影響

【0176】 為測定ActRIIB多肽增加ALS之小鼠模型之強度及存活性的能力，申請者測試SOD1小鼠中之ActRIIB-Fc蛋白。

【0177】 B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J或SOD1小鼠帶有高複本數之人類超氧化歧化酶轉殖基因之突變等位基因。高水平之此蛋白質將與人類疾病ALS相當之表型呈予小鼠。SOD1小鼠顯現上升性麻痺且至第91天為止顯示疾病之早期徵象。疾病導致19-23週齡之間的過早死亡發生。

【0178】 以10週齡起始用媒劑對照或鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc（經腹膜內，5 mg/kg，每週兩次）對SOD1小鼠給藥。小鼠當牽拉力傳感器時所施加之力為前肢握緊強度之量測。5次牽拉試驗之平均力用於組間之握緊強度比較。按小鼠出生之日與小鼠在被側放30秒內不能自我扶直之日之間的天數計算存活性。圖19展示握緊強度量測且圖20說明存活性數據。

【0179】 疾病末期之小鼠大概因麻痺進展而難以梳理毛髮且看似蓬亂。小鼠之粗略觀測揭示鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc治療組與PBS組相比即使在疾病末期仍看似毛髮梳理整潔。此觀測表明經治療之小鼠與對照相比健康狀況更佳且維持更高之生命品質。

【0180】 如圖19所見，接受鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc治療之SOD1小鼠與PBS對照組相比顯示顯著更高之握緊強度。此在第117天（疾病早期）以及在疾病已進展後第149天觀察到。圖20說明經ActRIIB (K74A 20-134)-Fc治療之小鼠比媒劑對照存活顯著更長時間。此研究說明鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc在ALS之小鼠模型中在改良該小鼠之強度與存活性方面的效用。

實施例8：ActRIIB-Fc蛋白對肥胖小鼠之肥胖及糖尿病的影響

【0181】 申請者測試餵食高脂肪膳食（HFD）小鼠中之人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc蛋白以測定人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc減輕肥胖之小鼠模型之肥胖的能力。

【0182】 II型糖尿病為肥胖症之主要併發症且特徵在於胰島素抗性。空腹胰島素水平升高為胰島素抗性之指示且提供測試動物是否處於胰島素抗性狀況之方式。申請者測定用鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc治療在標準化肥胖症之小鼠模型中之空腹胰島素水平方面的作用。

【0183】 將HFD餵食之C57BL/6小鼠維持於包含35%脂肪之膳食且當其體重比餵食標準飲食（4.5%脂肪）之年齡相配小鼠之體重重約50%時視為肥胖。每週兩次用媒劑對照或人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc（10 mg/kg；經腹膜內）對肥胖小鼠給藥。在給藥初及在給藥3週後對肥胖小鼠進行NMR掃描以測定體組成。體組成自基線之變化概述於圖21中。

【0184】 將小鼠用HFD餵食且當其體重比其標準飲食餵食對應物重50%時視為肥胖。用媒劑對照或鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc（5 mg/kg，每週兩次；經腹膜內）對HFD餵食小鼠給藥歷時35週。研究結束時，使小鼠禁食隔夜。禁食結束時，收集血液且針對血清進行處理。接著使用血清以測定兩組之空腹胰島素水平。鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc對肥胖小鼠之空腹胰島素水平之影響的結果概述於下表5中。

表5：來自經媒劑治療及經鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc治療之小鼠的空腹胰島素水平

	HFD PBS	HFD 鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc
平均值（ng/ml）±標準差	2.27 ± 1.64	0.78 ± 0.40
t測試	N/A	0.012

【0185】 圖21展示當與經媒劑治療之對照相比時鼠類ActRIIB (K74A 20-

134)-Fc組之肥胖減輕。發現經治療之小鼠與其基線水平相比脂肪質量減少25.9%。另外，鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc組使其瘦肉質量增加超過其基線水平10.1%。鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc之脂肪組織質量與瘦肉組織質量的變化百分數均顯著高於經PBS治療之組的變化百分數。

【0186】 在此模型中，將小鼠維持於高脂肪膳食直至其比其飲食餵食對應物重50%以上為止。基於體重及肥胖之此顯著增加，理所當然地，此模型可對應於特徵為病態肥胖之人。因此，用人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc蛋白治療減少肥胖小鼠之肥胖的發現可與病態肥胖人群之治療臨床上相關。

【0187】 表5中所概述之結果表明用鼠類ActRIIB (K74A 20-134)-Fc蛋白治療能顯著降低肥胖症相關之空腹血清胰島素水平升高。此發現支持使用ActRIIB多肽治療II型糖尿病之可能臨床相關性。

實施例9：ActRIIB-Fc蛋白對惡病質小鼠之肌肉質量的影響

【0188】 申請者測試人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc削弱糖皮質激素誘發之肌肉消瘦之小鼠模型之肌肉流失的能力。

【0189】 每天用PBS或地塞米松（dexamethasone）（2 mg/kg）對小鼠經皮下給藥歷時13天以誘發肌肉消瘦。經相同13天，經PBS治療及經地塞米松治療之組接受媒劑或人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc（10 mg/kg；經腹膜內；每週兩次）使得治療之所有組合得以呈現。第0天及第13天對小鼠進行NMR掃描以測定組間瘦肉組織質量的變化。NMR結果概述於下表6中。

表6：經媒劑治療及經鼠類ActRIIB (R64 20-134)-Fc治療之小鼠的瘦肉組織質量

組 (經皮下:經腹膜內治療)	第13天平均瘦肉-第0天平均瘦肉 (g) ±標準差
PBS:PBS	0.83 ± 0.94
地塞米松:PBS	0.47 ± 0.34 ^a
地塞米松:huActRIIB	2.56 ± 0.37 ^{a,b}
PBS:huActRIIB	3.63 ± 0.62 ^a
^a 與PBS:PBS相比差異顯著，p < 0.05	
^b 與地塞米松:PBS相比差異顯著，p < 0.05	

【0190】 NMR掃描顯示與PBS:PBS組相比地塞米松:PBS組之瘦肉組織質量顯著減小2.5%。相比之下，地塞米松:人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc組顯示瘦肉組織質量增加13.5%，當與PBS:PBS組與地塞米松:PBS組相比時顯著增加。惡病質為多種治療性療法（包括慢性糖皮質激素療法）的不合需要之副作用。因此，用人類ActRIIB (R64 20-134)-Fc蛋白治療可削弱與惡病質相關之肌肉消瘦可具臨床重要性。

實施例10：ActRIIB-Fc變體對野生型小鼠之肌肉質量的影響

【0191】 此研究顯示以下ActRIIB相關Fc構築體對6週齡C57BL/6雄性小鼠之肌肉質量及其他組織的影響。將小鼠稱重且兩週一次用PBS或ActRIIB相關Fc構築體（10 mg/kg）經腹膜內注射：

- ActRIIB (R64 20-134)-Fc
- ActRIIB (L79D 20-134)-Fc
- ActRIIB (L79E 20-134)-Fc
- ActRIIB (A24N 20-134)-Fc
- ActRIIB (R64K 20-134)-Fc

【0192】 在研究之初、研究中期及研究結束時對小鼠進行NMR掃描。將

股肌、胸肌及腓腸肌及肝、腎及脾稱重且儲存於福馬林（formalin）中。

【0193】 資料之初始分析指示ActRIIB (R64 20-134)-Fc引起肌肉質量及瘦體質的最大增加，同時對其他組織亦具有最大影響。L79D及L79E變體使肌肉質量較小程度地增加，同時對其他組織具有極小影響。A24N及R64K構築體對肌肉及其他組織具有中間影響。此等資料確認具有減小之活化素結合性的ActRIIB變體具有所需特性、尤其對肌肉組織的選擇性影響。

引置條款

【0194】 本文所提及之所有公開案及專利藉此以引用的方式全部併入，如同每一個別公開案或專利特定及個別地表示以引用的方式併入一般。

【0195】 儘管已討論標的物之特定具體實例，但上述說明為說明性的且並非限制性的。對本說明書及以下申請專利範圍的回顧之後，許多變化對於熟習此項技術者而言將變得顯而易見。本發明之完整範疇應藉由參考申請專利範圍連同其等效物之完整範疇一起及本說明書連同該等變化一起而確定。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商艾瑟勒朗法瑪公司(ACCELERON PHARMA INC.)

<120> 衍生自ActRIIB的變體與其用途

<130> TW 109134482

<150> 60/931,880

<151> 2007-05-25

<150> 60/927,088

<151> 2007-05-01

<150> 60/899,304

<151> 2007-02-02

<160> 32

<170> PatentIn 第3.5版

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala
1 5 10 15

Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr
 20 25 30

Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile
 35 40 45

Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile
 50 55 60

Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu
65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser
 85 90 95

Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr
100 105 110

Pro Lys Pro Pro
115

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15

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

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
35 40 45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60

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

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100 105 110

Thr Ala Pro Thr
115

<210> 3
<211> 513

I782836

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Met Gly Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
20 25 30

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
35 40 45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
50 55 60

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

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
145 150 155 160

Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln
165 170 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu
180 185 190

Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys
195 200 205

Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln
210 215 220

Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly
225 230 235 240

Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly
245 250 255

Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys
260 265 270

Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
275 280 285

Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
290 295 300

Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
305 310 315 320

Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
325 330 335

Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
340 345 350

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

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

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

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

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

Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
435 440 445

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

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

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
485 490 495

Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
500 505 510

Leu

<210> 4
<211> 512
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4
Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
1 5 10 15

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

Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg		
35						40						45					
Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg		
50						55						60					
Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp		
65						70						75			80		
Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn		
			85						90						95		
Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg		
			100						105						110		
Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro		
115						120						125					
Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu		
130						135						140					
Pro	Ile	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Trp	Met	Tyr		
145						150						155			160		
Arg	His	Arg	Lys	Pro	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Asp	Ile	His	Glu	Asp	Pro		
			165						170						175		
Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu		
			180						185						190		
Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Gly	Cys	Val	Trp	Lys	Ala	Gln		
195						200						205					
Leu	Met	Asn	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Leu	Gln	Asp	Lys		
210						215						220					
Gln	Ser	Trp	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Pro	Gly	Met	Lys		
225						230						235			240		

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
500 505 510

<210> 5
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
gctatacttg gtagatcaga aactcaggag tgtcttttct ttaatgctaa ttgggaaaaa 60

gacagaacca atcaaactgg tgttgaaccg tgttatgggtg acaaagataa acggcggcat 120

tgttttgcta cctggaagaa tatttctggt tccattgaaa tagtgaaaca aggttgttgg 180

ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gatttgttag aaaaaaaga cagccctgaa 240

gtatatTTTT gttgctgtga gggcaatatg tglaatgaaa agttttctta tttccagag 300

atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccc 348

<210> 6
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 6
tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgccaa ctgggagctg 60

gagcgcacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120

tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180

ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg cactgagga gaacccccag	240
gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttactca tttgccagag	300
gctggggggcc cggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc	348
<210> 7	
<211> 1542	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 7	
atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct	60
atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac	120
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt	180
tttctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaaacaagg ttgttggctg	240
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta	300
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg	360
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg	420
ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcgggggattg tcatttgtgc attttgggtg	480
tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttggtc caactcaaga ccaggacca	540
ccccacctt ctccattact agggttgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg	600
ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata	660
tttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg aagtctacag tttgcctgga	720
atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat	780
gtggatcttt ggctgacac agcatttcac gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag	840
gctaattgtg tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg	900
gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac	960
agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac	1020
tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataccca tggacaggtt	1080

ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat	1140
gcatttttga ggatagatat gtatgcatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc	1200
tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc	1260
cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgtttgtg ataaaaaaaa gaggcctgtt	1320
ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa	1380
tgttgggatc acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc	1440
cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg	1500
gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga	1542

<210> 8
<211> 1539
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8	
atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg	60
cgtagggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc	120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac	180
gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat	240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacc ccagggttac	300
ttctgctgt gtgaaggcaa ctctgcaac gagcgcttca ctcat ttgcc agaggctggg	360
ggcccgaag tcacgtacga gccacccccg acagcccca cctgctcac ggtgctggcc	420
tactactgc tgcccatcg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac	480
cggcatgca agcccccta cggtcattgt gacatccatg aggaccctgg gcctccacca	540
ccatccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc	600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca	660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag	720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag	780
ctgtggtc tcaaggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac	840

atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac	900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg	960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt	1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacgg acaggtaggc	1080
acgagacggt acatggctcc tgaggctgc gcaggagcca tcaacttcca gagagatgcc	1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc	1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag	1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggct gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt	1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc	1380
tgggacctg atgcagaggc tcgcttgctc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg	1440
attcggaggt cgggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg ttcccttgt gacctctgtc	1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa	1539

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9															
Met	Thr	Ala	Pro	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Ser	Leu	Trp
1			5						10					15	
Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr
			20					25					30		
Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg
			35				40					45			
Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala
			50				55				60				
Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp
65					70					75				80	

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala
115

<210> 10
<211> 122
<212> PRT
<213> 蜜蜂屬物種(Apis sp.)

<400> 10
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys
100 105 110

Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala
115 120

<210> 11
<211> 123
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 未知之描述：組織血纖維蛋白溶酶原活化子多肽

<400> 11
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe
 100 105 110

Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala
 115 120

<210> 12
<211> 135
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Val Ile Ser Cys

I782836

1

5

10

15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe

202530

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu

354045

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp

505560

Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu

65707580

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp

859095

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu

100105110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn

115120125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro

130135

<210> 13

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> Asp 或 Ala

<220>

<221> MOD_RES
<222> (100)..(100)
<223> Lys 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (212)..(212)
<223> Asn 或 Ala

<400> 13
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95

Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160

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

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205

Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

Lys
225

<210> 14
<211> 344
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

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

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

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
35 40 45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60

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

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

859095

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100105110

Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
115120125

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
130135140

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
145150155160

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
165170175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
180185190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
195200205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
210215220

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
225230235240

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
245250255

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
260265270

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
275280285

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 15
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 15
cagacagaca gacagacaga cagacagaca gacagacaga cagacaga 48

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 16
Thr Gly Gly Gly
1

<210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17
Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala
1 5 10 15

Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr
20 25 30

Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile
35 40 45

Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile
50 55 60

Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu
65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser
85 90 95

Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr
100 105 110

Pro Lys Pro Pro
115

<210> 18
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15

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

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
35 40 45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60

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

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100 105 110

Thr Ala Pro Thr
115

<210> 19
<211> 108
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 19
agccagacaa gccagacaag ccagacaagc cagacaagcc agacaagcca gacaagccag 60

acaagccaga caagccagac aagccagaca agccagacaa gccagaca 108

<210> 20
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20
Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
100 105 110

Lys Pro Pro Thr
115

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21
Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1 5 10 15

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

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
50 55 60

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

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105 110

Ala Pro Thr
115

<210> 22
<211> 150
<212> PRT
<213> 家鼠屬物種(Rattus sp.)

<400> 22
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 23
<211> 150
<212> PRT
<213> 野豬屬物種(Sus sp.)

<400> 23
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 24
<211> 150
<212> PRT
<213> 小鼠屬物種(Mus sp.)

<400> 24
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 25
<211> 150
<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 26

<211> 150

<212> PRT

<213> 牛屬物種(Bos sp.)

<400> 26

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys

I782836

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

<210> 27
<211> 150
<212> PRT
<213> 爪蟾屬物種(Xenopus sp.)

<400> 27
Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe
1 5 10 15

Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr

202530

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
354045

Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
505560

Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
65707580

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
859095

Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn
100105110

Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro
115120125

Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro
130135140

Ile Val Gly Leu Ser Met
145150

<210> 28
<211> 150
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28
Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
151015

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
202530

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu

35

40

45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
50 55 60

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

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile
145 150

<210> 29
<211> 154
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成一致多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Thr、Ala 或不存在

<220>
<221> MOD_RES
<222> (121)..(121)
<223> Pro、Ala、Val 或 Met

<400> 29
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn
100 105 110

Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
115 120 125

Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
130 135 140

Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
145 150

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成6xHis標籤

<400> 30

His His His His His His
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 31
Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 32
Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種融合蛋白，其包含：

a) 變體ActRIIB蛋白，其在對應於SEQ ID NO: 4之胺基酸位置20、21、22、23、24或25的胺基酸殘基處開始，並在對應於SEQ ID NO: 4之胺基酸位置128、129、130、131、132、133或134的胺基酸殘基處結束，其中所述蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置79的位置處包含酸性胺基酸；且其中所述變體ActRIIB蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過肌肉抑素（myostatin）及/或GDF11的信號轉導；及

b) 由免疫球蛋白Fc域組成的異源部分；

其中所述融合蛋白進一步包含位於所述ActRIIB蛋白與所述異源部分之間的甘胺酸連接子域。

【請求項2】如請求項1之融合蛋白，其中所述ActRIIB蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置64的位置處包含R。

【請求項3】如請求項1之融合蛋白，其中所述ActRIIB蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置64的位置處包含K。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述ActRIIB蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置79的位置處包含D。

【請求項5】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述ActRIIB蛋白在對應於SEQ ID NO: 4之位置79的位置處包含E。

【請求項6】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述連接子包含三個甘胺酸胺基酸。

【請求項7】如請求項6之融合蛋白，其中所述連接子進一步包含蘇胺酸或絲胺酸。

【請求項8】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白為同

源二聚體。

【請求項9】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白包含一或多個經修飾的胺基酸殘基，所述經修飾的胺基酸殘基係選自以下者：糖基化胺基酸、PEG化胺基酸、法呢基化（farnesylated）胺基酸、乙醯化胺基酸、經結合生物素之（biotinylated）胺基酸及與脂質部分結合之胺基酸。

【請求項10】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過肌肉抑素的信號轉導。

【請求項11】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過GDF11的信號轉導。

【請求項12】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白在基於細胞之檢定中抑制透過GDF11及肌肉抑素的信號轉導。

【請求項13】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白與GDF11結合。

【請求項14】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白與肌肉抑素結合。

【請求項15】如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中所述融合蛋白與GDF11及肌肉抑素結合。

【請求項16】一種醫藥製劑，其包含如請求項1至15中任一項之融合蛋白。

【請求項17】一種核酸，其編碼如請求項1至15中任一項之融合蛋白。

【請求項18】一種載體，其包含如請求項17之核酸。

【請求項19】一種細胞，其包含如請求項18之載體，其中所述細胞不在人體內。

【請求項20】如請求項19之細胞，其中所述細胞為CHO細胞。

【請求項21】一種製造融合蛋白的方法，其包含培養包含如請求項17之核酸或請求項18之載體的細胞，並表現所述融合蛋白，其中所述細胞不在人體內。

【請求項22】如請求項21之方法，其中所述細胞為CHO細胞。

【發明圖式】

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRTPDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP

圖 1

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT

圖2

MGAAAKLAFVFLISCSSG**AILGRSETQECLFFNANWEKDRTN****Q**TGVEPCYGDKD~~KRRH~~
CFATWKN**I**SGSIEIVK**Q**GCWLDDINCYDR**TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**
EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQD
PGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVY
SLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVS~~W~~NELCHIAET
MARGLAYLHEDI**PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIAD**FGLALKFEAGKSAG
DTHGQVGTRRYMAPEVLEGA**INFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASR**CTAADGPVDEYML
PFEEEIGQHPSLED**MQEVVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSA**
GCVGERIT**QMQR**LTNIITTEDIVTVV**TMV**TNVDFPPKES**L**

圖3

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHC
YASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE
AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG
PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST
PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETMS
RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEFGKPPGD
THGQVGTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP
FEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHGGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG
CVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

圖4

Gctatacttggtagatcagaaactcaggagtggtcttttctttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaa
tcaaactggtggtgaaccgtgttatggtgacaaagataaacggcggcattgttttgctacctggaagaata
tttctggttccattgaaatagtgaacaagggttggtggctggatgatatcaactgctatgacaggactgat
tgtgtagaaaaaaagacagccctgaagtatatTTTTTgttgctgtgagggcaatatgtgtaatgaaaagtt
ttcttattttccagagatggaagtcacacagcccacttcaaattccagttacacctaagccaccc

圖5

tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaa
ccagagcggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaaca
gctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggag
tgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgctt
cactcatttgccagaggctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccacc

圖6

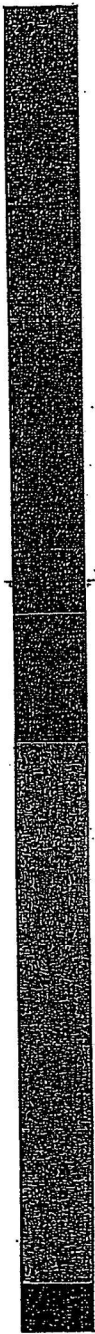
atgggagctgctgcaaagttggcggttgccgtctttcttatctcctgttcttcaggtgctatacttggttag
atcagaaaactcaggagtgtcttttctttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaatcaaactgggtgttg
aaccgtgttatggtgacaaagataaacggcggcattgttttgctacctggaagaatatttctggttccatt
gaaatagtgaacaaggttggtgctggatgatatacaactgctatgacaggactgattgtgtagaaaaaa
agacagccctgaagtataatgttgtgctgtgagggcaatatgtgtaatgaaaagtttcttattttccag
agatggaagtcacacagcccacttcaaatccagttacacctaagccaccctattacaacatcctgctctat
tccttggtgccacttatgttaattgcggggattgtcatttgtgcattttgggtgtacaggcatcacaagat
ggcctaccctcctgtacttgttccaactcaagaccaggaccacccccaccttctccattactaggggtga
aaccactgcagttattagaagtgaagcaaggggaagatttggttgtgtctggaaagcccagttgcttaac
gaatatgtggctgtcaaaatatttccaatacaggacaaacagtcatggcaaaatgaatacgaagtctacag
tttgcttggaatgaagcatgagaacatattacagttcattgggtgcagaaaaacgaggcaccagtgttgatg
tggatctttggctgatcacagcatttcatgaaaaggggtcactatcagactttcttaaggctaattgtggtc
tcttggaatgaactgtgtcatattgcagaaacctaggctagaggattggcatatttacatgaggatatacc
tggcctaaaagatggccacaaacctgccatatctcacagggcacatcaaaagtaaaatgtgctgttgaaaa
acaacctgacagcttgcatgtgactttgggttgccctaaaatttgaggctggcaagtctgcaggcgat
acccatggacaggttggtaccggagggtacatggctccagaggatttagagggtgctataaaacttccaaag
ggatgcatttttgaggatagatatgtatgccatgggattagtcctatgggaactggcttctcgtgtactg
ctgcagatggacctgtagatgaatacatgttgccatttgaggaggaaattggccagcatccatctcttgaa
gacatgcaggaagttgttgatgataaaaaaagaggcctgttttaagagattattggcagaaacatgctgg
aatggcaatgctctgtgaaacctgaagaatgttgggatcacgacgcagaagccaggttatcagctggat
gtgtaggtgaaagaattaccagatgcagagactaacaatatattattaccacagaggacattgtaacagtg
gtcacaatgggtgacaaatgttgactttcctcccaaagaatctagtctatga

圖7

atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtcttgggcgtggggagggc
tgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagc
gctgcgaaggcgagcaggacaagcggtgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgag
ctcgtgaagaagggctgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgagga
gaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttactcatttgccagagg
ctggggggcccgaagtcacgtacgagccacccccgacagccccaccctgctcacggtgctggcctactca
ctgctgcccacgggggcctttccctcatcgctcctgctggccttttggatgtaccggcatcgcaagcccc
ctacgggtcatgtggacatccatgaggaccctgggcctccaccaccatcccctctggtgggcctgaagccac
tgagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcagagtgaacgggagatcttcagcacacc
tggtgctcatcacggccttccatgacaagggctccctcacggattacctcaaggggaacatcatcacatgg
aacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctcatacctgcatgaggatgtgccctggtg
ccgtggcgagggccacaagccgtctattgccacagggactttaaaagtaagaatgtattgctgaagagcg
acctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcgatttgagccagggaaacctccaggggacacc
cacggacaggtaggcacgagacggtacatggctcctgaggtgctcgaggagccatcaacttccagagaga
tgcttctcgcgattgacatgtatgcatggggttggtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctg
cagacggaccctggatgagtacatgctgcccttgagggaagagattggccagcacccttcgttgaggag
ctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgaggccaccattaaagatcactggttgaaacacccgggcct
ggccagcttctgtgaccatcgaggagtgtgggacatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtg
tgaggagcggtgtccctgattcggaggtcggtcaacggcactacctcggactgtctcgtttccctggtg
acctctgtcaccaatgtggacctgccccctaaagagtcaagcatctaa

圖8

構築體之基本一般特徵



信號序列：原生、蜜蜂融合或TPA



胞外域



突變Fc



-Fc受體結合及補體活化減少
-循環中之半衰期增加

圖9

原生信號序列：
MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGL
ERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVAT
EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

HBML信號序列：
MKFLVNVALVFMVVYISYIYASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG
LERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV
ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

TPA信號序列：
MDAMKRG LCCVLLCGAVFVSPSGRGEAETRECIYYNANWELERTN
QSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

圖10

MGAAAKLAFVVISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTV
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPKPP

圖 11

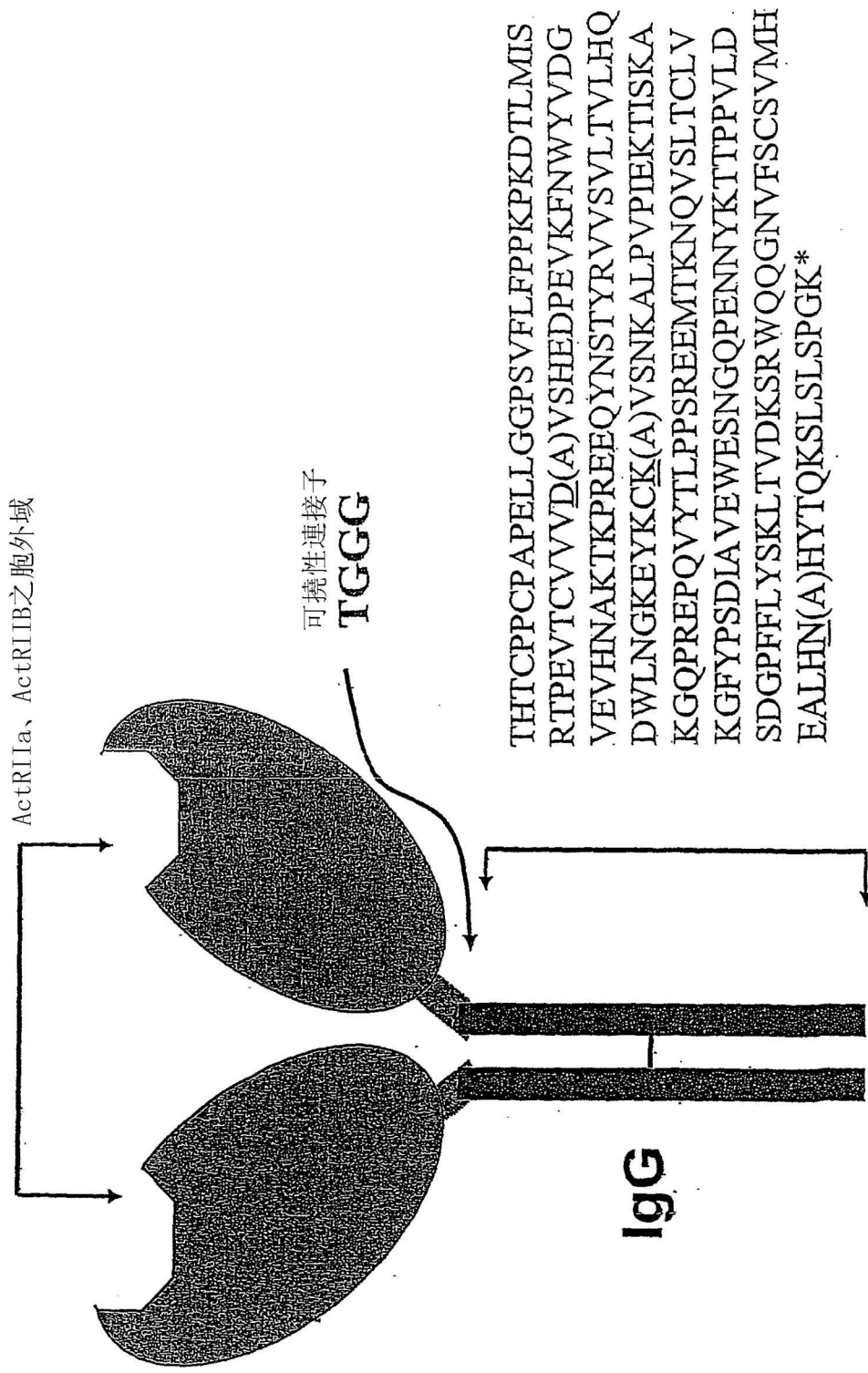


圖12

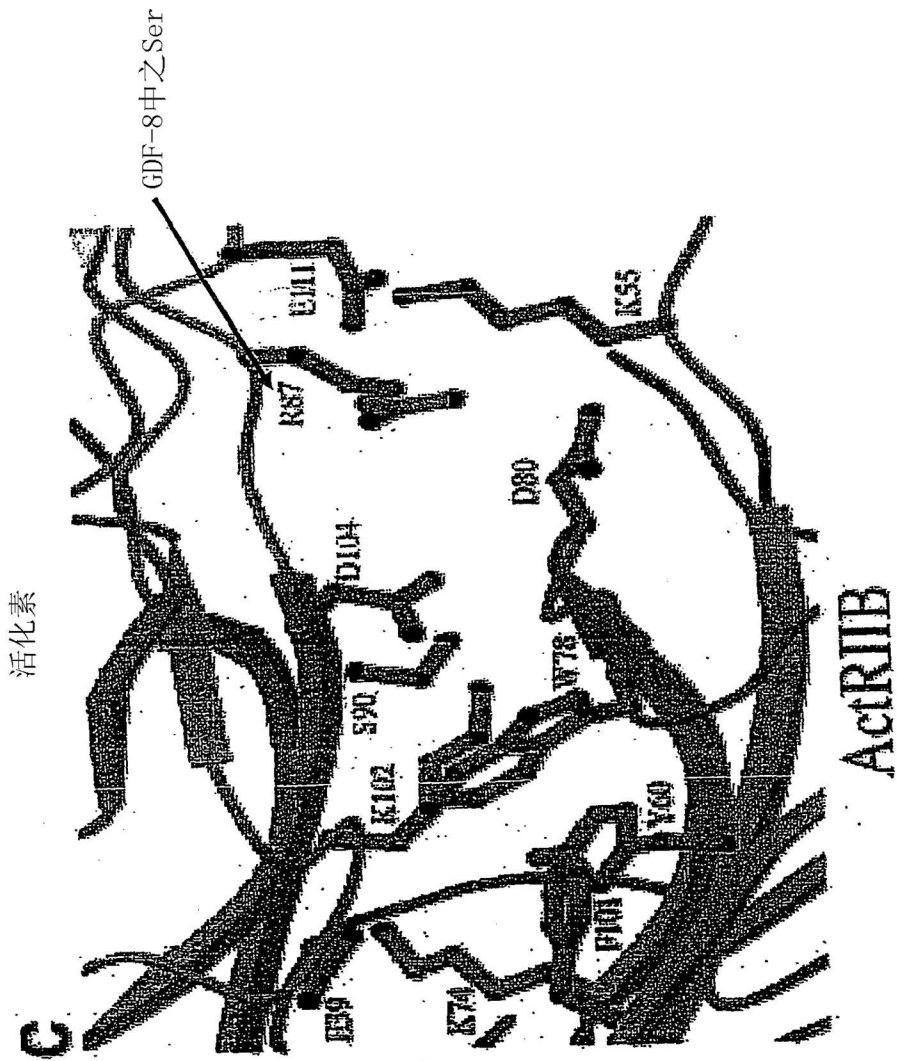


圖13

RIIA 20 AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDD 82
G +ET+EC+++NANWE +RTNQ+G+E C G++DKR HC+A+W N SG+IE+VK+GCWLDD
RIIB 19 SGRGEAETRECIYYNANWEELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD 81

83 INCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTOPTSNNPVTTPKPP 135
NCYDR +CV +++P+VYFCCCEGN CNE+F++ PE + T P P
82 ENCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT 134

圖14

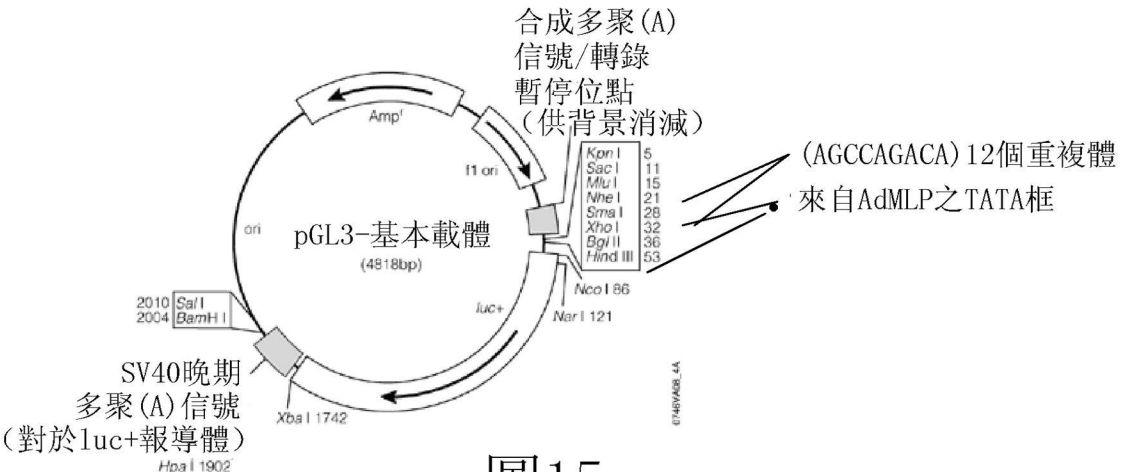


圖15

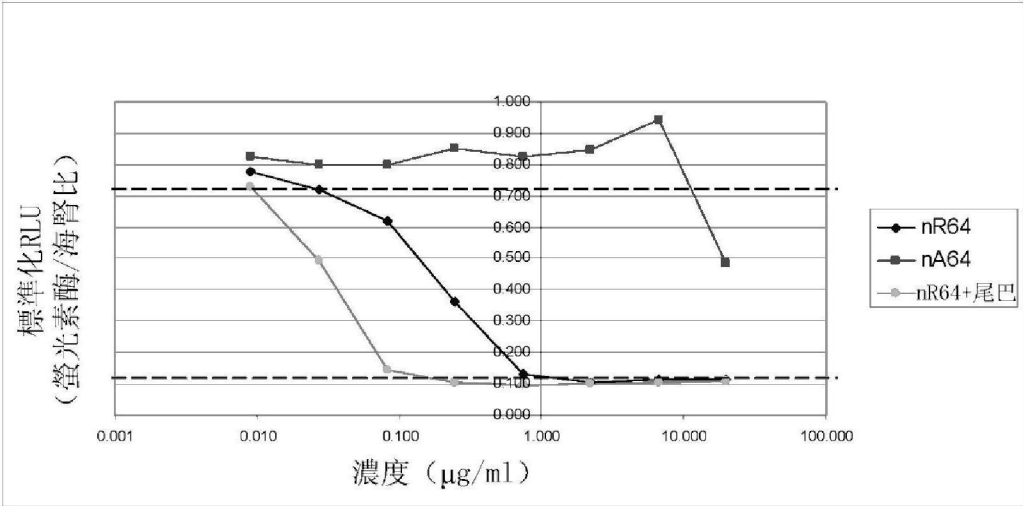


圖16

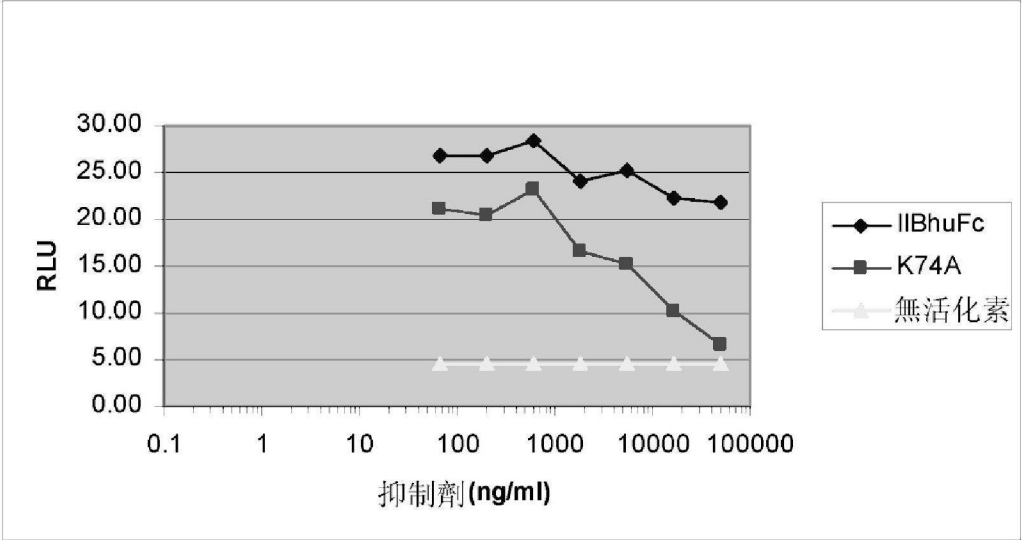


圖17

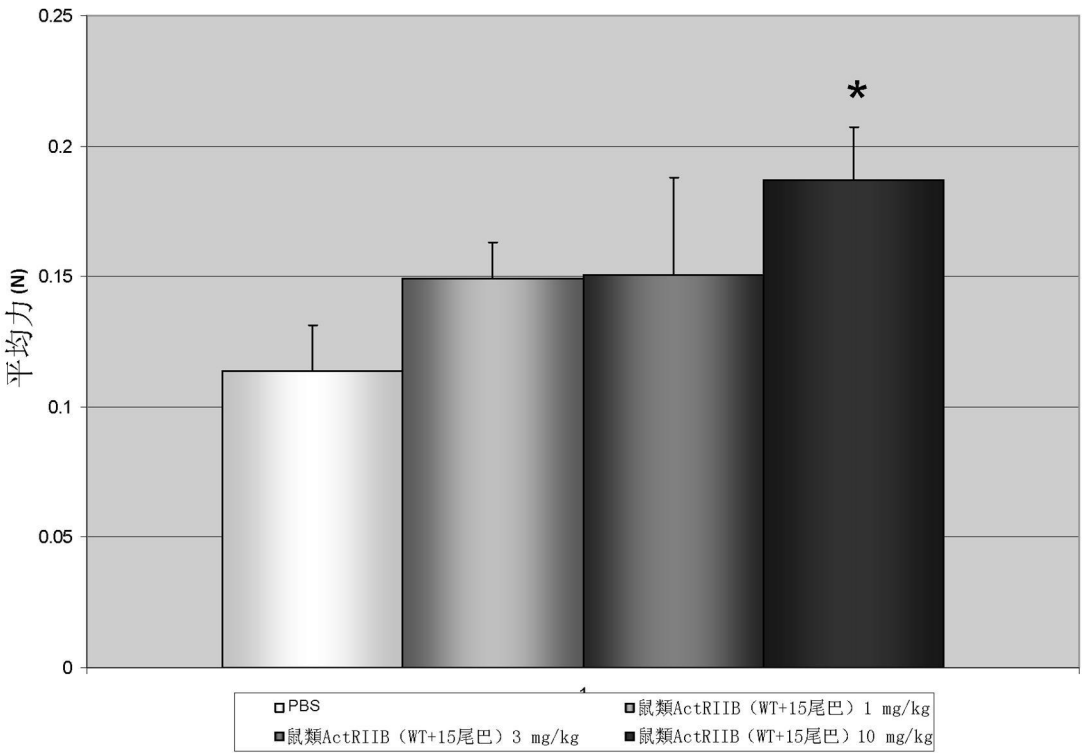


圖18

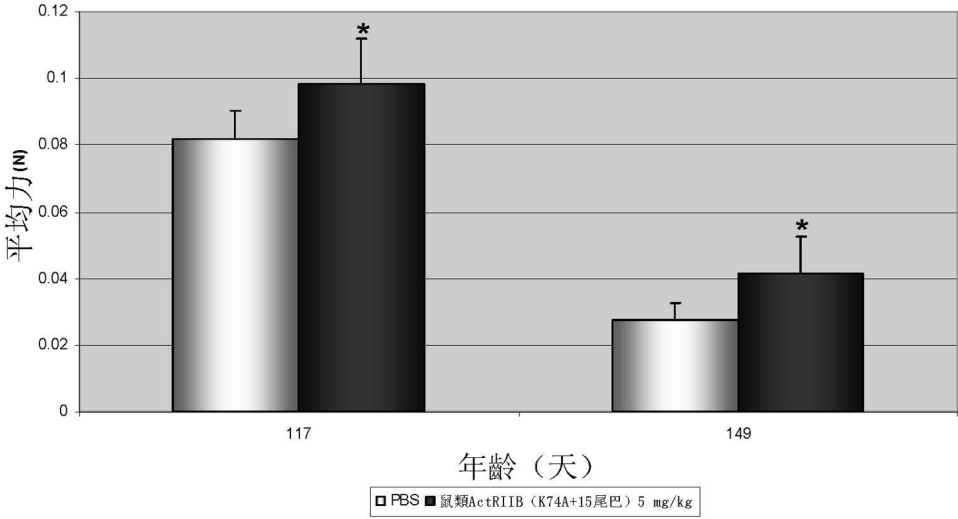


圖19

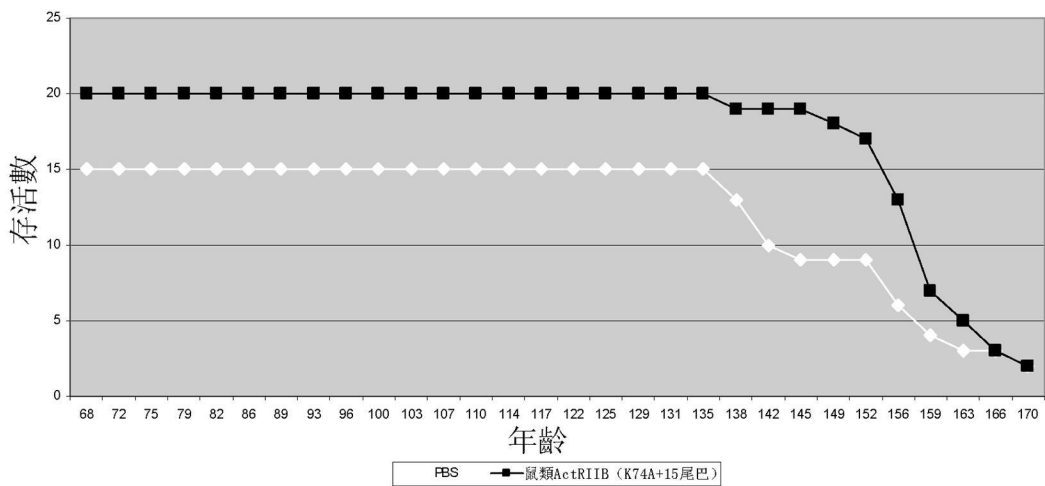


圖20

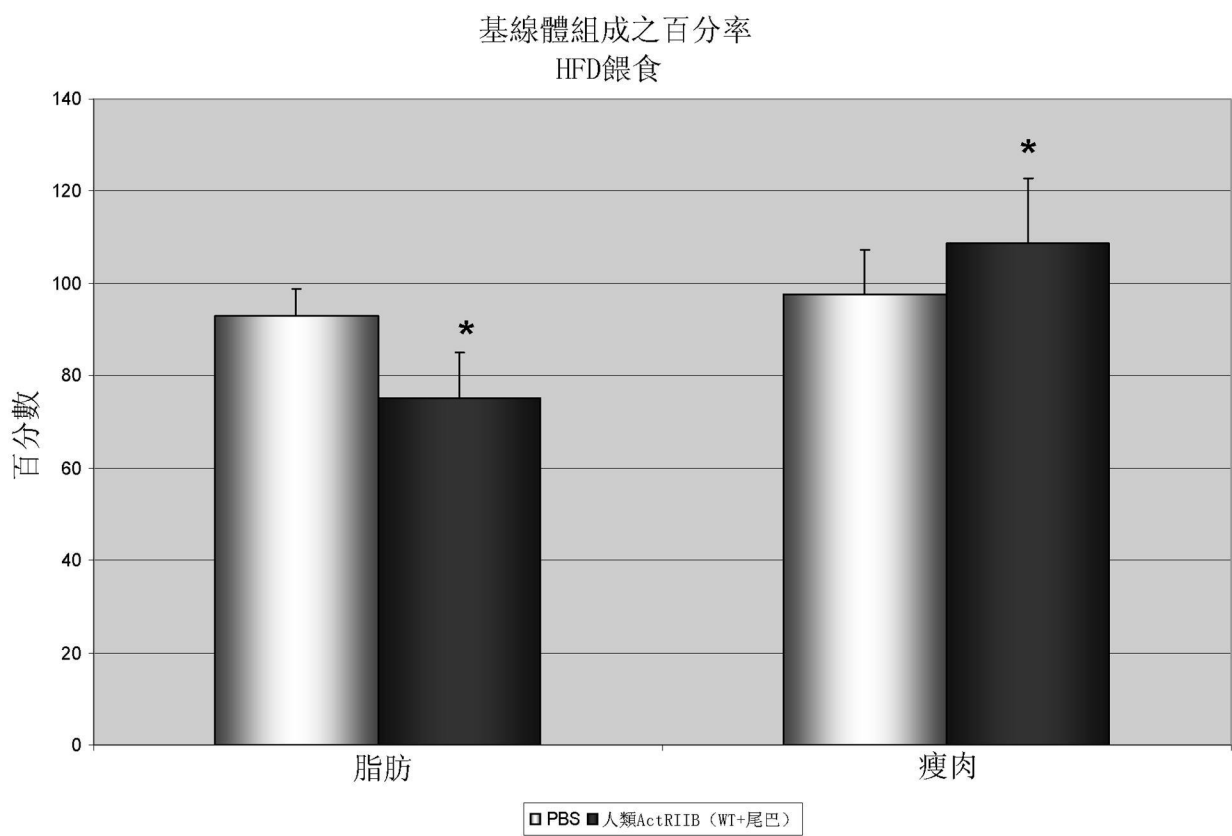


圖21

ActRIIa

ActRIIb

ILGRSETQEC

LEFNANWEKD

RTNQTGVEPC

YGD~~K~~DKRRHC

FATWKNISGS

GRGEAETREC

IYYNANWELE

RTN~~Q~~SGIERC

EGE~~Q~~DKRLHC

YASWRNSSGT

IEIVKQGCWL

DDINCYDRTD

CVEKKDSPEV

YFCCCEGNMC

NEKFSYFP

EM

IELVKKGCWL

DDFN~~C~~YDRQE

CVATEENPQV

YFCCCEGNFC

NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV

TPKPPT

GGPEVTYEPP

PTAPT

圖22

[illegible]