



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110494155 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201880023489.0

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22)申请日 2018.01.31

代理人 封新琴

(30)优先权数据

62/453,413 2017.02.01 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 47/68(2006.01)

2019.09.30

A61K 39/395(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00(2006.01)

PCT/US2018/016148 2018.01.31

A61P 37/04(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/144542 EN 2018.08.09

(71)申请人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·S·皮尔萨尔 R·库马尔

权利要求书11页 说明书145页 附图24页

(54)发明名称

用于提高免疫活性的TGF  $\beta$  和ActRII拮抗剂

(57)摘要

本文公开了提高包括例如癌症患者的有需要的患者的免疫应答和/或活性的TGF  $\beta$  拮抗剂和ActRII拮抗剂以及方法。例如，公开了在癌症治疗中、以及在诱导免疫应答、治疗或预防免疫耗竭、诱导或增强针对抗原的免疫应答、针对病原体或癌症与病原体或癌症抗原组合进行疫苗接种以及增强由疫苗诱导的免疫应答的方法中使用ActRIIB-Fc和TGF  $\beta$  抗体的组合的方法。进一步包括在所述方法中的抗TGF-  $\beta$  单一疗法。

1. 一种诱导或增强患者的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予:

a. ActRII拮抗剂;和

b. TGF $\beta$ 拮抗剂,

其中所述ActRII拮抗剂和所述TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。

2. 一种治疗患者的癌症或肿瘤的方法,其包括向有需要的患者给予:

a. ActRII拮抗剂;和

b. TGF $\beta$ 拮抗剂,

其中所述ActRII拮抗剂和所述TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。

3. 一种治疗或预防患者的免疫耗竭的方法,其包括向有需要的患者给予:

a. ActRII拮抗剂;和

b. TGF $\beta$ 拮抗剂,

其中所述ActRII拮抗剂和所述TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。

4. 一种诱导或增强患者的针对抗原的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予:

i) TGF $\beta$ 拮抗剂, ii) ActRII拮抗剂, 和 iii) 所述抗原, 其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂、所述ActRII拮抗剂和所述抗原是以有效量给予。

5. 一种针对病原体或癌症对患者进行疫苗接种的方法,其包括向有需要的患者给予:

i) TGF $\beta$ 拮抗剂, ii) ActRII拮抗剂, 和 iii) 病原体或癌症抗原, 其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂、所述ActRII拮抗剂和所述抗原是以有效对所述患者进行疫苗接种的量来给予。

6. 一种增强患者的由疫苗诱导的免疫应答的方法,其包括以有效增强患者的由所述疫苗诱导的免疫应答的量向所述患者给予:i) TGF $\beta$ 拮抗剂, 和 iii) ActRII拮抗剂。

7. 一种增强患者的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 拮抗剂。

8. 一种治疗患者的癌症或肿瘤的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。

9. 一种治疗或预防患者的免疫耗竭的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。

10. 一种诱导或增强患者的针对抗原的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予:

i) TGF $\beta$ 拮抗剂和 ii) 所述抗原, 其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂和所述抗原是以有效量给予。

11. 一种针对病原体或癌症对患者进行疫苗接种的方法,其包括向有需要的患者给予:

i) TGF $\beta$ 拮抗剂和 ii) 病原体或癌症抗原, 其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂和所述抗原是以有效对所述患者进行疫苗接种的量来给予。

12. 一种增强患者的由疫苗诱导的免疫应答的方法,其包括以有效增强患者的由所述疫苗诱导的免疫应答的量向所述患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂。

13. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者患有癌症或肿瘤。

14. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答是针对癌症或肿瘤。

15. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答抑制所述患者体内癌症或肿瘤细胞的生长。

16. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答降低所述患者

的癌症或肿瘤细胞负担。

17. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答治疗或预防癌症或肿瘤转移。

18. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述癌症或肿瘤促进所述患者的免疫抑制。

19. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述癌症或肿瘤促进所述患者的免疫细胞耗竭。

20. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述癌症或肿瘤促进T细胞耗竭。

21. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述癌症或肿瘤对免疫疗法有反应。

22. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者患有选自以下的癌症或肿瘤:白血病、黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、肺癌(例如,鳞状非小细胞肺癌)、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤(例如,转移性间皮瘤)、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、食管癌、胃癌、结肠直肠癌(例如,结直肠癌)、肝癌(例如,肝细胞癌)、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤(例如,转移性肉瘤)。

23. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答是针对病原体。

24. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的、刺激的或增强的免疫应答治疗或预防所述患者的病原体感染。

25. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述病原体促进所述患者的免疫抑制。

26. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述病原体促进所述患者的免疫细胞耗竭。

27. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述病原体促进T细胞耗竭。

28. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述病原体对免疫疗法有反应。

29. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述病原体选自:细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。

30. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者有发生免疫耗竭的风险。

31. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。

32. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答包含T细胞免疫应答。

33. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述抗原是癌症或肿瘤抗原。

34. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述癌症或肿瘤抗原与选自以下的癌症或肿瘤相关:白血病、黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、肺癌(例如,鳞状非小细胞肺癌)、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤(例如,转移性间皮瘤)、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、食管癌、胃癌、结肠直肠癌(例如,结直肠癌)、肝癌(例如,肝细胞癌)、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤(例如,转移性肉瘤)。

35. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述抗原是病原体抗原。

36. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述病原体抗原与选自以下的病原体相关:细菌病原体、病毒病原体、真菌病原体或寄生虫病原体。

37. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述癌症或病原体抗原是根据疫苗接种方案来给予。

38. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述启动的或增强的免疫应答针对癌症或病原体对所述患者进行疫苗接种。

39. 根据任一前述权利要求的方法,其中向所述患者进一步给予用于治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。

40. 根据任一前述权利要求的方法,其中向所述患者进一步给予用于治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。

41. 根据任一前述权利要求的方法,其中向所述患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。

42. 根据权利要求41的方法,其中所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自:阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1(PD-L1)结合剂(例如,PD-L1抗体)、CD20定向细胞溶解结合剂(例如,CD-20抗体)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)结合剂(例如,CTLA-4抗体)和程序性死亡受体-1(PD-1)结合剂(例如,PD-1抗体)。

43. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者没有患自身免疫疾病。

44. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。

45. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述患者没有患移植植物抗宿主病。

46. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂结合至TGF $\beta$ 2。

47. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂抑制TGF $\beta$ 2。

48. 根据权利要求47的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂在基于细胞的测定中抑制TGF $\beta$ 2。

49. 根据权利要求46-48中任一项的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂抑制进一步结合至TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3。

50. 根据权利要求49的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂抑制TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3。

51. 根据权利要求46的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂基本上不结合至TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3(例如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的K<sub>D</sub>结合至TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3)。

52. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂是抗体或抗体组合。

53. 根据权利要求52的方法,其中所述抗体结合至TGF $\beta$ 2。

54. 根据权利要求52的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。

55. 根据权利要求52的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。

56. 根据权利要求52-55中任一项的方法,其中所述抗体是多特异性抗体。

57. 根据权利要求56的方法,其中所述抗体是双特异性抗体。

58. 根据权利要求52-57中任一项的方法,其中所述抗体或抗体组合进一步结合至选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。

59. 根据权利要求58的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至激活素。

60. 根据权利要求59的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至激活素A。

61. 根据权利要求52-60中任一项的方法,其中所述抗体或抗体组合进一步结合至i)ActRIIA, ii) ActRIIB, 或 iii) ActRIIA和ActRIIB。

62. 根据权利要求55的方法,其中所述抗体是夫苏木单抗。

63. 根据权利要求1-51中任一项的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂是TGF $\beta$ RII多肽。

64. 根据权利要求63中任一项的方法,其中所述TGF $\beta$ RII多肽选自:

a) 包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；和

b) 包含与SEQ ID N0:35的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

65. 根据权利要求63或64的方法，其中所述TGF $\beta$ RII多肽是融合蛋白，其进一步包含免疫球蛋白Fc结构域。

66. 根据权利要求65的方法，其中所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG1 Fc免疫球蛋白结构域。

67. 根据权利要求65或66的方法，其中所述融合蛋白包含定位于所述TGF $\beta$ RII多肽结构域与所述免疫球蛋白Fc结构域之间的接头结构域。

68. 根据权利要求67的方法，其中所述接头选自：GGG (SEQ ID N0:27)、GGGG (SEQ ID N0:28)、TGGGG (SEQ ID N0:29)、SGGGG (SEQ ID N0:30)、TGGG (SEQ ID N0:31)、SGGG (SEQ ID N0:32) 或GGGGS (SEQ ID N0:33)。

69. 根据权利要求65-68中任一项的方法，其中所述融合蛋白选自：

a. 包含与SEQ ID N0:148的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；和

b. 包含与SEQ ID N0:150的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

70. 根据权利要求63-69中任一项的方法，其中所述多肽或融合蛋白包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰：糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和缀合至脂质部分的氨基酸。

71. 根据权利要求70的方法，其中所述多肽或融合蛋白是糖基化的并且具有哺乳动物糖基化模式。

72. 根据权利要求71的方法，其中所述多肽或融合蛋白具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。

73. 根据权利要求63-72中任一项的方法，其中融合蛋白的所述多肽结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。

74. 根据权利要求73的方法，其中所述多肽或融合蛋白抑制TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。

75. 根据任一前述权利要求的方法，其中所述ActRII拮抗剂结合至选自以下的一种或多种配体：激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。

76. 根据任一前述权利要求的方法，其中所述ActRII拮抗剂抑制选自以下的一种或多种配体：激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。

77. 根据权利要求75的方法，其中所述ActRII拮抗剂结合至激活素A。

78. 根据权利要求76的方法，其中所述ActRII拮抗剂抑制激活素A。

79. 根据任一前述权利要求的方法，其中所述ActRIIB拮抗剂是抗体或抗体组合。

80. 根据权利要求79的方法，其中所述抗体或抗体组合结合至选自以下的一种或多种配体：激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。

81. 根据权利要求80的方法，其中所述抗体或抗体组合结合至激活素A。

82. 根据权利要求79-81中任一项的方法，其中所述抗体是多特异性抗体。

83. 根据权利要求82的方法，其中所述抗体是双特异性抗体。

84. 根据权利要求79-83中任一项的方法,其中所述抗体或抗体组合进一步结合至选自以下的一种或多种配体:TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。

85. 根据权利要求84的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 2。

86. 根据权利要求84的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。

87. 根据权利要求79-86中任一项的方法,其中所述抗体或抗体组合进一步结合至i) ActRIIA, ii) ActRIIB, 或 iii) ActRIIA和ActRIIB。

88. 根据权利要求84的方法,其中所述抗体是夫苏木单抗。

89. 根据权利要求1-78中任一项的方法,其中所述ActRII拮抗剂是ActRIIA多肽。

90. 根据权利要求89的方法,其中所述ActRIIA多肽选自:

a. 包含与SEQ ID N0:10的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

b. 包含与SEQ ID N0:11的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

c. 包含与SEQ ID N0:9的氨基酸30-110的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

91. 根据权利要求1-78中任一项的方法,其中所述ActRII拮抗剂是ActRIIB多肽。

92. 根据权利要求91的方法,其中所述ActRIIB多肽选自:

a. 包含与SEQ ID N0:1的氨基酸29-109至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

b. 包含与SEQ ID N0:1的氨基酸25-131至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

c. 包含与SEQ ID N0:2的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

d. 包含与SEQ ID N0:3的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

e. 包含与SEQ ID N0:5的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

f. 包含与SEQ ID N0:6的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

g. 包含与SEQ ID N0:65的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

h. 包含与SEQ ID N0:68的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

i. 包含与SEQ ID N0:69的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

j. 包含与SEQ ID N0:133的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

93. 根据权利要求92的方法,其中所述多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处不包含酸性氨基酸。

94. 根据权利要求93的方法,其中所述多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处不包含D或E。

95. 根据权利要求89-94中任一项的方法,其中所述ActRIIA或ActRIIB多肽是融合蛋白,其进一步包含免疫球蛋白Fc结构域。

96. 根据权利要求95的方法,其中所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG1 Fc免疫球蛋白结构域。

97. 根据权利要求95或96的方法,其中所述融合蛋白包含定位于所述ActRIIA或ActRIIB多肽结构域与所述免疫球蛋白Fc结构域之间的接头结构域。

98. 根据权利要求97的方法,其中所述接头选自:GGG (SEQ ID N0:27)、GGGG (SEQ ID N0:28)、TGGGG (SEQ ID N0:29)、SGGGG (SEQ ID N0:30)、TGGG (SEQ ID N0:31)、SGGG (SEQ ID N0:32) 或GGGGS (SEQ ID N0:33)。

99. 根据权利要求95-98中任一项的方法,其中所述融合蛋白是选自以下的ActRIIA-Fc融合蛋白:

a. 包含与SEQ ID N0:50的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

b. 包含与SEQ ID N0:54的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

c. c) 包含与SEQ ID N0:57的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

100. 根据权利要求95-98中任一项的方法,其中所述融合蛋白是选自以下的ActRIIB-Fc融合蛋白:

a. 包含与SEQ ID N0:58的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

b. 包含与SEQ ID N0:60的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

c. 包含与SEQ ID N0:63的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

d. 包含与SEQ ID N0:64的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

e. 包含与SEQ ID N0:66的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

f. 包含与SEQ ID N0:70的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

g. 包含与SEQ ID N0:123的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

h. 包含与SEQ ID N0:131的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

i. 包含与SEQ ID N0:132的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

101. 根据权利要求89-100中任一项的方法,其中所述多肽或融合蛋白包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和缀合至脂质部分的氨基酸。

102. 根据权利要求101的方法,其中所述多肽或融合蛋白是糖基化的并且具有哺乳动物糖基化模式。

103. 根据权利要求102的方法,其中所述多肽或融合蛋白具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。

104. 根据权利要求89-103中任一项的方法,其中融合蛋白的所述多肽结合至选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。

105. 根据权利要求104的方法,其中融合蛋白的所述多肽结合至激活素A。

106. 根据权利要求89-105中任一项的方法,其中所述多肽或融合蛋白抑制选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。

107. 根据权利要求106的方法,其中所述多肽或融合蛋白抑制激活素A。

108. 根据权利要求1-78中任一项的方法,其中所述ActRII拮抗剂是包含ALK4多肽和ActRIIB多肽的异多聚体。

109. 根据权利要求108的方法,其中所述ALK4多肽包含选自以下的多肽:

a. 包含与在SEQ ID NO:14的氨基酸24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:14的氨基酸101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126中的任一个处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

b. 包含与SEQ ID NO:14的氨基酸34-101至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

c. 包含与SEQ ID NO:14的氨基酸24-126至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

d. 包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

e. 包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

110. 根据权利要求108或109的方法,其中所述ActRIIB多肽包含选自以下的多肽:

a. 包含与在SEQ ID NO:1的氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:1的氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任一个处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;

- b. 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；
- c. 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；
- d. 包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；
- e. 包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；
- f. 包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；和
- g. 包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

111. 根据权利要求108-110中任一项的异多聚体，其中所述ActRIIB多肽在对应于SEQ ID NO:1的L79的位置处不包含酸性氨基酸。

112. 根据权利要求108-111中任一项的异多聚体，其中所述ALK4多肽是融合蛋白，其进一步包含异源结构域，所述异源结构域包含相互作用对的第一或第二成员。

113. 根据权利要求108-112中任一项的异多聚体，其中所述ActRIIB多肽是融合蛋白，其进一步包含异源结构域，所述异源结构域包含相互作用对的第一或第二成员。

114. 根据权利要求112或113的异多聚体，其中所述异源结构域是Fc免疫球蛋白结构域。

115. 根据权利要求108-114中任一项的异多聚体，其中所述ALK4多肽和/或ActRIIB多肽包含促进异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。

116. 根据权利要求112-115中任一项的方法，其中所述ALK4和/或ActRIIB融合蛋白进一步包含定位于所述ALK4和/或ActRIIB结构域与所述异源结构域之间的接头结构域。

117. 根据权利要求116的方法，其中所述接头结构域选自：TGGG (SEQ ID NO:31)、TGGGG (SEQ ID NO:29)、SGGGG (SEQ ID NO:30)、GGGGS (SEQ ID NO:33)、GGG (SEQ ID NO:27)、GGGG (SEQ ID NO:28) 和SGGG (SEQ ID NO:32)。

118. 根据权利要求112-117中任一项的异多聚体，其中所述ALK4融合蛋白包含选自以下的多肽：

a. 包含与SEQ ID NO:74的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

b. 包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

c. 包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

d. 包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

e. 包含与SEQ ID NO:143的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；和

f. 包含与SEQ ID NO:145的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

119. 根据权利要求112-118中任一项的异多聚体，其中所述ActRIIB融合蛋白包含选自以下的多肽：

a. 包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

b. 包含与SEQ ID NO:73的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

c. 包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

d. 包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

e. 包含与SEQ ID NO:139的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；和

f. 包含与SEQ ID NO:141的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

120. 根据权利要求108-119中任一项的方法，其中所述ALK4和/或ActRIIB多肽或融合蛋白包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰：糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和缀合至脂质部分的氨基酸。

121. 根据权利要求120的方法，其中所述ALK4和/或ActRIIB多肽或融合蛋白是糖基化的并且具有哺乳动物糖基化模式。

122. 根据权利要求121的方法,其中所述ALK4和/或ActRIIB多肽或融合蛋白具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。

123. 根据权利要求108-122中任一项的方法,其中异多聚体结合至选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8和BMP6。

124. 根据权利要求123的方法,其中所述异多聚体结合至激活素A。

125. 根据权利要求108-124中任一项的方法,其中所述异多聚体抑制选自以下的一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8和BMP6。

126. 根据权利要求125的方法,其中所述异多聚体抑制激活素A。

127. 根据权利要求108-126中任一项的方法,其中所述异多聚体不结合或基本上不结合至选自以下的一种或多种配体:BMP10、BMP9和GDF3。

128. 根据权利要求108-127中任一项的方法,其中所述异多聚体以与相应ActRIIB同多聚体相比较低的亲和力结合至BMP10、BMP9或GDF3中的一种或多种。

129. 根据权利要求108-128中任一项的方法,其中所述异多聚体在药物制剂中。

130. 根据权利要求129的方法,其中所述药物制剂包含少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%的ALK4同多聚体。

131. 根据权利要求129或130的方法,其中所述药物制剂包含少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%的ActRIIB同多聚体。

132. 根据权利要求108-131中任一项的方法,其中所述异多聚体是ALK4:ActRIIB异二聚体。

133. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述ActRII拮抗剂结合至ActRIIA和/或ActRIIB。

134. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述ActRII拮抗剂抑制ActRIIA和/或ActRIIB。

135. 根据权利要求133或134的方法,其中所述ActRII拮抗剂是抗体或抗体组合。

136. 根据权利要求135的方法,其中所述ActRII拮抗剂结合至ActRIIA和/或ActRIIB。

137. 根据权利要求133-136中任一项的方法,其中所述抗体是多特异性抗体。

138. 根据权利要求137的方法,其中所述抗体是双特异性抗体。

139. 根据权利要求133-138中任一项的方法,其中所述抗体或抗体组合进一步结合至选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。

140. 根据权利要求139的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至激活素A。

141. 根据权利要求139或140的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 2。

142. 根据权利要求139或140的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。

143. 根据权利要求139或140的方法,其中所述抗体或抗体组合结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。

144. 根据权利要求143的方法,其中所述抗体是夫苏木单抗。

145. 一种诱导或增强患者的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂。

146. 一种治疗患者的癌症或肿瘤的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的

ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂。

147. 一种治疗或预防患者的免疫耗竭的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂。

148. 一种诱导或增强患者的针对抗原的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予:i) ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂和ii) 所述抗原,其中所述ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂和所述抗原是以有效量给予。

149. 一种针对病原体或癌症对患者进行疫苗接种的方法,其包括向有需要的患者给予:i) ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂和ii) 病原体或癌症抗原,其中所述ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂和所述抗原是以有效对所述患者进行疫苗接种的量来给予。

150. 一种增强患者的由疫苗诱导的免疫应答的方法,其包括以有效增强患者的由所述疫苗诱导的免疫应答的量向所述患者给予ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂。

151. 根据权利要求145-150中任一项的方法,其中所述方法是如权利要求13-144中任一项所述来进行。

152. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述ActRII拮抗剂是结合至ActRIIA和/或ActRIIB的抗体,并且所述TGF $\beta$ 拮抗剂是结合至TGF $\beta$ 2的抗体。

153. 根据权利要求152的方法,其中所述TGF $\beta$ 抗体进一步结合至TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3。

154. 根据任一前述权利要求的方法,其中所述TGF $\beta$ 拮抗剂是 $\beta$ 聚糖多肽。

155. 根据权利要求154的方法,其中所述 $\beta$ 聚糖多肽是可溶的。

156. 根据权利要求154或155的方法,其中所述 $\beta$ 聚糖多肽是Fc融合蛋白。

## 用于提高免疫活性的TGF $\beta$ 和ActRII拮抗剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年2月1日提交的美国临时申请号62/453,413的优先权权益。将前述申请的说明书通过引用以其整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 在癌症治疗中,早已认识到,化学疗法与高毒性相关,并且可能导致出现抗性癌细胞变体。即使使用针对对于肿瘤存活和生长重要的过表达或激活的癌蛋白的靶向疗法,癌细胞也经常突变并适应以降低对所靶向途径的依赖性,如通过利用冗余途径。癌症免疫疗法是癌症治疗中的新范例,其并非靶向癌细胞,而是集中于免疫系统的激活。其原理是重新武装宿主的免疫应答,特别是适应性T细胞应答,以识别并杀死癌细胞以及实现长效的保护性免疫。由于这些疗法针对提高免疫系统的活性,还在研究癌症免疫治疗剂改善在其他障碍中、特别是在病原体具有免疫逃避性和/或损害宿主的免疫系统的感染性疾病中的免疫应答的能力。

[0004] FDA于2011年批准抗CTLA-4抗体伊匹单抗(ipilimumab)用于治疗黑色素瘤开创了癌症免疫疗法的新纪元。在临床试验中证明抗PD-1或抗PD-L1疗法在黑色素瘤、肾癌和肺癌中诱导持久的反应进一步表明免疫疗法在一系列广泛的癌症的治疗中的潜在用途(Pardoll, D.M., Nat Immunol. 2012; 13: 1129-32)。然而,可用的或在临床试验中的许多癌症免疫疗法具有限制。例如,伊匹单抗疗法具有高毒性特征,可能是由于抗CTLA-4治疗通过干扰初始T细胞抑制性检查点而可能导致产生新的自身反应性T细胞。虽然抑制PD-L1/PD-1相互作用导致解除对最具抗病毒或抗癌性的耗竭T细胞中现有长期免疫应答的抑制(Wherry, E.J., Nat Immunol. 2011; 12: 492-9),然而抗PD-1疗法有时可能导致可能致命的肺相关自身免疫不良事件。

[0005] 因此,对于提高患者、特别是患有癌症或感染性疾病的患者的免疫应答的有效疗法仍存在高度未满足的需求。因此,本公开文本的目标是提供改善提高有需要的患者的免疫应答以及治疗癌症和感染性疾病的方法。

### 发明内容

[0006] 部分地,本文所呈现的数据证明,ActRII拮抗剂(抑制剂)和TGF $\beta$ 拮抗剂(特别是TGF $\beta$ 2的抑制剂)可以单独或组合用于治疗癌症。具体地,显示单独用ActRIIA多肽、ActRIIB多肽或泛特异性TGF $\beta$ 抗体治疗在癌症模型中降低肿瘤负担并延长存活时间。此外,显示与单独使用任一种药剂所观察到的效果相比,与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂可以用于协同地提高抗肿瘤活性。因此,本公开文本部分地提供了单独地或与一种或多种支持疗法和/或活性剂组合地使用ActRII拮抗剂、TGF $\beta$ 拮抗剂或ActRII拮抗剂与TGF $\beta$ 拮抗剂的组合治疗癌症、特别是治疗或预防癌症的一种或多种并发症(例如,降低肿瘤负担)的方法。另外,数据指示,ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂疗法的功效依赖于免疫系统。因此,部分地,本公开文本涉及以下发现:ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂可以用作免疫治疗药,特别是用于治疗众多的癌症(例如,

与免疫抑制和/或免疫耗竭相关的癌症)。与其他已知的免疫-肿瘤学药剂一样,ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂增强患者的免疫应答的能力可以具有超出癌症领域的更广泛的治疗意义。例如,已经提出,免疫增强剂可用于治疗众多的感染性疾病,特别是促进免疫抑制和/或免疫耗竭的病原剂。此类免疫增强剂还可用于加强疫苗(例如,感染性疾病和癌症疫苗)的免疫功效。因此,本公开文本提供了多种ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂,其可以单独或组合用于提高有需要的受试者的免疫应答,治疗癌症,治疗感染性疾病,和/或提高免疫功效,任选地与一种或多种支持疗法和/或其他活性剂组合。

[0007] 虽然例子中描述的ActRIIA多肽、ActRIIB多肽和TGF $\beta$ 抗体可以通过除了抑制ActRII结合和/或TGF $\beta$ RII结合配体以外的机制影响免疫系统和/或癌症[例如,抑制GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB和激活素AE)、BMP6、GDF3、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3中的一种或多种可能是药剂抑制一系列其他药剂的活性的倾向的指示物,所述其他药剂可能包括这个配体超家族的其他成员,并且这种集体抑制可能导致对例如癌症的所需作用],但是预期其他类型的ActRII信号传导和TGF $\beta$ RII信号传导途径抑制剂[例如,ActRII和/或TGF $\beta$ RII配体抑制剂;I型、II型和/或共受体抑制剂(例如,ALK4、ALK5、ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII和 $\beta$ 聚糖中的一种或多种的抑制剂);和下游信号传导抑制剂(例如,诸如Smad 2和Smad 3等一种或多种Smad蛋白的抑制剂)]可根据本公开文本的方法和用途来使用,包括例如抗体拮抗剂、核酸拮抗剂、小分子拮抗剂和配体阱(例如,可溶性ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、TGF $\beta$ RII多肽、ALK4:ActRIIB异二聚体、卵泡抑素多肽和FLRG多肽)。如本文所用,抑制ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)活性的药剂被统称为“ActRII拮抗剂”或“ActRII抑制剂”,并且包括例如抑制以下中的一种或多种的药剂:ActRIIA、ActRIIB、ALK4和ActRII配体[例如,激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB和激活素AE)、GDF11、GDF8、BMP6、GDF3、BMP10和BMP9]。如本文所用,抑制TGF $\beta$ RII活性的药剂被统称为“TGF $\beta$ 拮抗剂”或“TGF $\beta$ 抑制剂”,并且包括例如抑制以下中的一种或多种的药剂:TGF $\beta$ RII、ALK5、 $\beta$ 聚糖和TGF $\beta$ RII配体(例如,TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3)。

[0008] 在某些方面中,本公开文本涉及诱导患者的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂,其中ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。在其他方面中,本公开文本涉及增强患者的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂,其中ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。在一些方面中,本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂诱导或增强有需要的患者的免疫应答的用途。在一些方面中,本公开文本涉及与ActRII拮抗剂组合的TGF $\beta$ 拮抗剂诱导或增强有需要的患者的免疫应答的用途。在一些实施方案中,患者患有癌症。在一些实施方案中,患者患有肿瘤。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答是针对癌症。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答是针对肿瘤。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答抑制癌症生长。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答抑制肿瘤生长。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中,癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中,肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中,癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中,肿瘤促进患者

的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答是针对病原体。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗患者的病原体感染。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答预防患者的病原体感染。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体选自：细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。在一些实施方案中，患者有发生免疫耗竭的风险。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答包含T细胞免疫应答。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对癌症或病原体对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗（alemtuzumab）、伊匹单抗、纳武单抗（nivolumab）、奥法木单抗（ofatumumab）、利妥昔单抗、派姆单抗（pembrolizumab）、阿替利珠单抗（atezolizumab）、程序性死亡配体1（PD-L1）结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4（CTLA-4）结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1（PD-1）结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0009] 在某些方面中，本公开文本涉及治疗患者的癌症的方法，其包括向有需要的患者给予ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂，其中ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。在其他方面中，本公开文本涉及治疗患者的肿瘤的方法，其包括向有需要的患者给予ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂，其中ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。在一些方面中，本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂治疗有需要的患者的癌症或肿瘤的用途。在一些方面中，本公开文本涉及与ActRII拮抗剂组合的TGF $\beta$ 拮抗剂治疗有需要的患者的癌症或肿瘤的用途。在一些实施方案中，所述方法抑制癌症生长。在一些实施方案中，所述方法抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，所述方法降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，所述方法降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有

选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，患者有发生免疫耗竭的风险。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0010] 在某些方面中，本公开文本涉及治疗患者的免疫耗竭的方法，其包括向有需要的患者给予ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂，其中ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。在一些方面中，本公开文本涉及预防患者的免疫耗竭的方法，其包括向有需要的患者给予ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂，其中ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂是以有效量给予。在一些方面中，本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂用于治疗或预防免疫耗竭的用途。在一些方面中，本公开文本涉及与ActRII拮抗剂组合的TGF $\beta$ 拮抗剂用于治疗或预防免疫耗竭的用途。在一些实施方案中，患者患有癌症。在一些实施方案中，患者患有肿瘤。在一些实施方案中，所述方法抑制癌症生长。在一些实施方案中，所述方法抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，所述方法降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，所述方法降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，患者被病原体感染。在一些实施方案中，所述方法治疗患者的病原体感染。在一些实施方案中，所述方法预防患者的病原体感染。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体选自：细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。在一些实施方案中，免疫耗竭包含T细胞免疫耗竭。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支

持疗法。在一些实施方案中,向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中,向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中,所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自:阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1(PD-L1)结合剂(例如,PD-L1抗体)、CD20定向细胞溶解结合剂(例如,CD-20抗体)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)结合剂(例如,CTLA-4抗体)和程序性死亡受体-1(PD-1)结合剂(例如,PD-1抗体)。在一些实施方案中,患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中,患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中,患者没有患移植植物抗宿主病。

[0011] 在某些方面中,本公开文本涉及诱导患者的针对抗原的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予:TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和抗原,其中TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和抗原是以有效量给予。在一些方面中,本公开文本涉及增强患者的针对抗原的免疫应答的方法,其包括向有需要的患者给予:TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和抗原,其中TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和抗原是以有效量给予。在一些方面中,本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂用于诱导或增强针对抗原的免疫应答的用途。在一些实施方案中,抗原是癌症抗原。在一些实施方案中,抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中,癌症或肿瘤抗原与选自以下的癌症或肿瘤相关:白血病、黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、肺癌(例如,鳞状非小细胞肺癌)、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤(例如,转移性间皮瘤)、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、食管癌、胃癌、结肠直肠癌(例如,结直肠癌)、肝癌(例如,肝细胞癌)、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤(例如,转移性肉瘤)。在一些实施方案中,抗原是病原体抗原。在一些实施方案中,病原体抗原与选自以下的病原体相关:细菌病原体、病毒病原体、真菌病原体或寄生虫病原体。在一些实施方案中,癌症抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中,肿瘤抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中,病原体抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答针对癌症对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答针对肿瘤对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中,启动的或增强的免疫应答针对病原体对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中,向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中,向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中,向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中,所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自:阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1(PD-L1)结合剂(例如,PD-L1抗体)、CD20定向细胞溶解结合剂(例如,CD-20抗体)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)结合剂(例如,CTLA-4抗体)和程序性死亡受体-1(PD-1)结合剂(例如,PD-1抗体)。在一些实施方案中,癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中,肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中,癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中,肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中,癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中,肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中,癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中,肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中,病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中,病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中,病原体

促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0012] 在某些方面中，本公开文本涉及针对癌症对患者进行疫苗接种的方法，其包括向有需要的患者给予：TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和癌症抗原，其中TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和抗原是以有效对患者进行疫苗接种的量来给予。在一些方面中，本公开文本涉及针对病原体对患者进行疫苗接种的方法，其包括向有需要的患者给予：TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和病原体抗原，其中TGF $\beta$ 拮抗剂、ActRII拮抗剂和抗原是以有效对患者进行疫苗接种的量来给予。在一些方面中，本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂和癌症抗原组合的ActRII拮抗剂针对癌症对患者进行疫苗接种的用途。在一些方面中，本公开文本涉及与ActRII拮抗剂和癌症抗原组合的TGF $\beta$ 拮抗剂针对癌症对患者进行疫苗接种的用途。在一些方面中，本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂和病原体抗原组合的ActRII拮抗剂针对病原体对患者进行疫苗接种的用途。在一些方面中，本公开文本涉及与ActRII拮抗剂和病原体抗原组合的TGF $\beta$ 拮抗剂针对病原体对患者进行疫苗接种的用途。在一些实施方案中，癌症或肿瘤抗原与选自以下的癌症或肿瘤相关：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，病原体抗原与选自以下的病原体相关：细菌病原体、病毒病原体、真菌病原体或寄生虫病原体。在一些实施方案中，癌症抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，肿瘤抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，病原体抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1(PD-L1)结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1(PD-1)结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0013] 在某些方面中，本公开文本涉及增强患者的由疫苗诱导的免疫应答的方法，其包括以有效增强患者的由疫苗诱导的免疫应答的量向患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂和ActRII拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂增强有需要的患者的由疫苗诱导的免疫应答的用途。在一些方面中，本公开文本涉及与ActRII拮抗剂组合的TGF $\beta$ 拮抗剂增强有需要的患者的由疫苗诱导的免疫应答的用途。在一些实施方案中，疫苗是癌症疫苗。在一些实施方案中，疫苗是肿瘤疫苗。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答抑制癌症生长。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，疫苗是病原体疫苗。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗患者的病原体感染。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答预防患者的病原体感染。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体选自：细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。在一些实施方案中，患者有发生免疫耗竭的风险。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答包含T细胞免疫应答。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对癌症或病原体对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0014] 在某些方面中，本公开文本涉及诱导患者的免疫应答的方法，其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及增强患者的免疫应答的方法，其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及TGF $\beta$

拮抗剂用于诱导或增强有需要的患者的免疫应答的用途。在一些实施方案中，患者患有癌症。在一些实施方案中，患者患有肿瘤。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答是针对癌症。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答是针对肿瘤。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答抑制癌症生长。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答是针对病原体。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗患者的病原体感染。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答预防患者的病原体感染。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体选自：细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。在一些实施方案中，患者有发生免疫耗竭的风险。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答包含T细胞免疫应答。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对癌症或病原体对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0015] 在某些方面中，本公开文本涉及治疗患者的癌症的方法，其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及治疗患者的肿瘤的方法，其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及TGF $\beta$ 拮抗剂用于治疗有需要的患者的癌症或肿瘤的用途。在一些实施方案中，所述方法抑制癌症生长。在一些实施方案中，所述方法抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，所述方法降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，所述方法降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，所述方

法治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，患者有发生免疫耗竭的风险。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0016] 在某些方面中，本公开文本涉及治疗患者的免疫耗竭的方法，其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及预防患者的免疫耗竭的方法，其包括向有需要的患者给予有效量的TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些实施方案中，本公开文本涉及TGF $\beta$ 拮抗剂用于治疗或预防有需要的患者的免疫耗竭的用途。在一些实施方案中，患者患有癌症。在一些实施方案中，患者患有肿瘤。在一些实施方案中，所述方法抑制癌症生长。在一些实施方案中，所述方法抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，所述方法降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，所述方法降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，所述方法治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，患者被病原体感染。在一些实施方案中，所述方法治疗患者的病原体感染。在一些实施方案中，所述方法预防患者的病原体感染。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原

体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体选自：细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。在一些实施方案中，免疫耗竭包含T细胞免疫耗竭。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂(例如，PD-L1抗体)、CD20定向细胞溶解结合剂(例如，CD-20抗体)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂(例如，CTLA-4抗体) 和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂(例如，PD-1抗体)。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0017] 在某些方面中，本公开文本涉及诱导患者的针对抗原的免疫应答的方法，其包括向有需要的患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂和抗原，其中TGF $\beta$ 拮抗剂和抗原是以有效量给予。在某些方面中，本公开文本涉及增强患者的针对抗原的免疫应答的方法，其包括向有需要的患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂和抗原，其中TGF $\beta$ 拮抗剂和抗原是以有效量给予。在一些方面中，本公开文本涉及TGF $\beta$ 拮抗剂用于诱导或增强有需要的患者的针对抗原的免疫应答的用途。在一些实施方案中，抗原是癌症抗原。在一些实施方案中，抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中，癌症或肿瘤抗原与选自以下的癌症或肿瘤相关：白血病、黑色素瘤(例如，转移性黑色素瘤)、肺癌(例如，鳞状非小细胞肺癌)、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤(例如，转移性间皮瘤)、头颈癌(例如，头颈鳞状细胞癌)、食管癌、胃癌、结肠直肠癌(例如，结直肠癌)、肝癌(例如，肝细胞癌)、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤(例如，转移性肉瘤)。在一些实施方案中，抗原是病原体抗原。在一些实施方案中，病原体抗原与选自以下的病原体相关：细菌病原体、病毒病原体、真菌病原体或寄生虫病原体。在一些实施方案中，癌症抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，肿瘤抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，病原体抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对癌症对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对肿瘤对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对病原体对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂(例如，PD-L1抗体)、CD20定向细胞溶解结合剂(例如，CD-20抗体)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂(例如，CTLA-4抗体) 和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂(例如，PD-1抗体)。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原

体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0018] 在某些方面中，本公开文本涉及针对癌症对患者进行疫苗接种的方法，其包括向有需要的患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂和癌症抗原，其中TGF $\beta$ 拮抗剂和抗原是以有效对患者进行疫苗接种的量来给予。在一些方面中，本公开文本涉及针对病原体对患者进行疫苗接种的方法，其包括向有需要的患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂和病原体抗原，其中TGF $\beta$ 拮抗剂和抗原是以有效对患者进行疫苗接种的量来给予。在一些方面中，本公开文本涉及与病原体或癌症抗原组合的TGF $\beta$ 拮抗剂用于针对病原体或癌症对患者进行疫苗接种的用途。在一些实施方案中，癌症或肿瘤抗原与选自以下的癌症或肿瘤相关：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，病原体抗原与选自以下的病原体相关：细菌病原体、病毒病原体、真菌病原体或寄生虫病原体。在一些实施方案中，癌症抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，肿瘤抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，病原体抗原是根据疫苗接种方案来给予。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1（PD-L1）结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4（CTLA-4）结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1（PD-1）结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植物抗宿主病。

[0019] 在某些方面中，本公开文本涉及增强患者的由疫苗诱导的免疫应答，其包括以有效增强患者的由疫苗诱导的免疫应答的量向患者给予TGF $\beta$ 拮抗剂。在一些方面中，本公开文本涉及TGF $\beta$ 拮抗剂用于增强有需要的患者的由疫苗诱导的免疫应答的用途。在一些实施方案中，疫苗是癌症疫苗。在一些实施方案中，疫苗是肿瘤疫苗。在一些实施方案中，启动的

或增强的免疫应答抑制癌症生长。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答抑制肿瘤生长。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答降低患者的癌细胞负担。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答降低患者的肿瘤细胞负担。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗或预防癌症转移。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗或预防肿瘤转移。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，癌症促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，肿瘤促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，癌症对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，肿瘤对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，患者患有选自以下的癌症或肿瘤：白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）。在一些实施方案中，疫苗是病原体疫苗。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答治疗患者的病原体感染。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答预防患者的病原体感染。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫抑制。在一些实施方案中，病原体促进患者的免疫细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体促进T细胞耗竭。在一些实施方案中，病原体对免疫疗法有反应。在一些实施方案中，病原体选自：细菌、病毒、真菌或寄生虫病原体。在一些实施方案中，患者有发生免疫耗竭的风险。在一些实施方案中，患者患有与免疫耗竭相关的疾病或病症。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答包含T细胞免疫应答。在一些实施方案中，启动的或增强的免疫应答针对癌症或病原体对患者进行疫苗接种。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗癌症或肿瘤的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予治疗病原体的一种或多种其他活性剂和/或支持疗法。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他免疫-肿瘤学药剂选自：阿仑单抗、伊匹单抗、纳武单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗、派姆单抗、阿替利珠单抗、程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合剂（例如，PD-L1抗体）、CD20定向细胞溶解结合剂（例如，CD-20抗体）、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 结合剂（例如，CTLA-4抗体）和程序性死亡受体-1 (PD-1) 结合剂（例如，PD-1抗体）。在一些实施方案中，患者没有患自身免疫疾病。在一些实施方案中，患者没有正在经历组织或器官移植或者尚未接受组织或器官移植。在一些实施方案中，患者没有患移植植物抗宿主病。

[0020] 在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂是可以抑制ActRII（例如，ActRIIA和/或ActRIIB受体）和/或ALK4、特别是抑制下游信号传导的药剂。因此，在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂是可以抑制一种或多种ActRII和/ALK4结合配体[例如，GDF11、GDF8、激活素（激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E）、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]的药剂。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂是可以抑制ActRII和/或ALK4信号传导途径的一种或多种细胞内介体（例如，Smad 2和Smad 3）的药剂。此类ActRII拮抗剂药剂包括例如ActRII (ActRIIA或ActRIIB) 多肽、或ActRII多肽的组合、以及其变体（例如，GDF阱多肽）；抗体、或抗体组合，其抑制一种或多种ActRII配体、ALK4受体和/或ActRII受体；多核苷酸、或多核苷酸组合，其抑制一种或多种ActRII配体、ALK4、

ActRII受体和/或ActRII和/或ALK4下游信号传导组分(例如,Smad)；小分子、或小分子组合,其抑制一种或多种ActRII配体、ALK4、ActRII受体和/或ActRII和/或ALK4下游信号传导组分(例如,Smad)；以及其组合。在某些优选实施方案中,要根据本公开文本的教导使用的ActRII拮抗剂至少抑制激活素,特别是激活素A。

[0021] 在某些方面中,要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制GDF11的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对GDF11抑制的作用,所述测定包括本文所述的那些(例如,Smad信号传导报告基因测定)。因此,在一些实施方案中,本公开文本的GDF11拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少GDF11。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性,所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中,本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ (例如,至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ )的K<sub>D</sub>结合至至少GDF11。

[0022] 在某些方面中,要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制GDF8的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对GDF8抑制的作用,所述测定包括本文所述的那些(例如,Smad信号传导报告基因测定)。因此,在一些实施方案中,本公开文本的GDF8拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少GDF8。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性,所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中,本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ (例如,至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ )的K<sub>D</sub>结合至至少GDF8。

[0023] 在某些方面中,要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB和激活素AE)的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对激活素抑制的作用,所述测定包括本文所述的那些(例如,Smad信号传导报告基因测定)。因此,在一些实施方案中,本公开文本的激活素拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少激活素。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性,所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中,本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ (例如,至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ )的K<sub>D</sub>结合至至少激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E。在一些实施方案中,本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ (例如,至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ )的K<sub>D</sub>结合至至少激活素A。

[0024] 在某些方面中,要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制BMP6的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对BMP6抑制的作用,所述测定包括本文所述的那些(例如,Smad信号传导报告基因测定)。因此,在一些实施方案中,本公开文本的BMP6拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少BMP6。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性,所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中,本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ (例如,至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ )的K<sub>D</sub>结合至至少BMP6。

[0025] 在某些方面中,要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制GDF3的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对GDF3抑制的作用,所述测定包括本文所述的那些(例如,Smad信号传导报告基因测定)。因此,在一些实施方案中,本

公开文本的GDF3拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少GDF3。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性，所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ （例如，至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ ）的 $K_D$ 结合至至少GDF3。

[0026] 在某些方面中，要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制BMP9的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对BMP9抑制的作用，所述测定包括本文所述的那些（例如，Smad信号传导报告基因测定）。因此，在一些实施方案中，本公开文本的BMP9拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少BMP9。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性，所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ （例如，至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ ）的 $K_D$ 结合至至少BMP9。

[0027] 在某些方面中，要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制BMP10的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对BMP10抑制的作用，所述测定包括本文所述的那些（例如，Smad信号传导报告基因测定）。因此，在一些实施方案中，本公开文本的BMP10拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少BMP10。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性，所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ （例如，至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ ）的 $K_D$ 结合至至少BMP10。

[0028] 在某些方面中，要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制ActRIIA的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对ActRIIA抑制的作用，所述测定包括本文所述的那些（例如，Smad信号传导报告基因测定）。因此，在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少ActRIIA。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性，所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ （例如，至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ ）的 $K_D$ 结合至至少ActRIIA。在一些实施方案中，结合至和/或抑制ActRIIA的ActRII拮抗剂可以进一步结合至和/或抑制ActRIIB。

[0029] 在某些方面中，要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制ActRIIB的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对ActRIIB抑制的作用，所述测定包括本文所述的那些（例如，Smad信号传导报告基因测定）。因此，在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少ActRIIB。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性，所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1 \times 10^{-7} M$ （例如，至少 $1 \times 10^{-8} M$ 、至少 $1 \times 10^{-9} M$ 、至少 $1 \times 10^{-10} M$ 、至少 $1 \times 10^{-11} M$ 或至少 $1 \times 10^{-12} M$ ）的 $K_D$ 结合至至少ActRIIB。在一些实施方案中，结合至和/或抑制ActRIIB的ActRII拮抗剂可以进一步结合至和/或抑制ActRIIA。

[0030] 在某些方面中，要根据本文所述的方法和用途使用的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合是至少抑制ALK4的药剂。可以例如使用基于细胞的测定来确定对ALK4抑制的作用，所述测定包括本文所述的那些（例如，Smad信号传导报告基因测定）。因此，在一些实施方案中，本公开文本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合可以结合至至少ALK4。可以例如使用结合亲和力测定来确定配体结合活性，所述测定包括例如本文所述的那些。在一些实施方案中，本公开文

本的ActRII拮抗剂或拮抗剂组合以至少 $1\times 10^{-7}M$ (例如,至少 $1\times 10^{-8}M$ 、至少 $1\times 10^{-9}M$ 、至少 $1\times 10^{-10}M$ 、至少 $1\times 10^{-11}M$ 或至少 $1\times 10^{-12}M$ )的K<sub>D</sub>结合至至少ALK4。

[0031] 在某些方面中,本公开文本涉及包含ActRII多肽的组合物及其用途。术语“ActRII多肽”共同地是指天然存在的ActRIIA和ActRIIB多肽以及其截短物和变体,如本文所述的那些(例如,GDF阱多肽)。优选地,ActRII多肽包含ActRII多肽或其经修饰(变体)形式的配体结合结构域,基本上由所述配体结合结构域组成或由所述配体结合结构域组成。例如,在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含ActRIIA多肽的ActRIIA配体结合结构域,例如ActRIIA细胞外结构域的一部分。类似地,ActRIIB多肽可以包含ActRIIB多肽的ActRIIB配体结合结构域,例如ActRIIB细胞外结构域的一部分。优选地,要根据本文所述的方法使用的ActRII多肽是可溶性多肽。

[0032] 在某些方面中,本公开文本涉及ActRIIA多肽、包含所述ActRIIA多肽的组合物以及所述ActRIIA多肽和组合物的用途。例如,在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在仍甚至其他实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0033] 在其他方面中,本公开文本涉及ActRIIB多肽、包含所述ActRIIB多肽的组合物以及所述ActRIIB多肽和组合物的用途。例如,在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处不包含酸性氨基酸[天然存在的(E或D)或人工酸性氨基酸]。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处不



基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:63的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:63的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处不包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:64的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:64的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:65的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:65的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:66的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:66的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:68的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:68的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处不包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:69的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIB多肽可以包含与SEQ ID N0:69的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:70的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:70的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID N0:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:123的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:123的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序

列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处不包含酸性氨基酸。在仍甚至其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:131的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:131的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:132的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:132的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处包含酸性氨基酸。在其他实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:133的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:133的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中ActRIIB多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处包含酸性氨基酸。

[0034] 在其他方面中,本公开文本涉及包含GDF阱多肽的组合物及其用途。在一些实施方案中,包含经改变的ActRII配体结合结构域的GDF阱具有的激活素A结合的K<sub>d</sub>与GDF11和/或GDF8结合的K<sub>d</sub>的比率相对于野生型配体结合结构域的所述比率高至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。任选地,包含经改变的配体结合结构域的GDF阱具有的抑制激活素A的IC<sub>50</sub>与抑制GDF11和/或GDF8的IC<sub>50</sub>的比率相对于野生型ActRII配体结合结构域高至少2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、100倍或甚至1000倍。任选地,包含经改变的配体结合结构域的GDF阱抑制GDF11和/或GDF8的IC<sub>50</sub>比抑制激活素A的IC<sub>50</sub>低至少2、5、10、20、50或甚至100倍。这些GDF阱可以是包括免疫球蛋白Fc结构域(野生型或突变型)的融合蛋白。在某些情况下,主题可溶性GDF阱是GDF8和/或GDF11介导的细胞内信号传导(例如,Smad 2/3信号传导)的拮抗剂(抑制剂)。

[0035] 在一些实施方案中,本公开文本提供了GDF阱,其是可溶性ActRIIB多肽,所述多肽包含经改变的配体结合(例如,GDF11结合)结构域。具有经改变的配体结合结构域的GDF阱可以包含例如在人ActRIIB的诸如以下等氨基酸残基处的一个或多个突变:E37、E39、R40、K55、R56、Y60、A64、K74、W78、L79、D80、F82和F101(编号是相对于SEQ ID NO:1)。任选地,相对于ActRIIB受体的野生型配体结合结构域,经改变的配体结合结构域对诸如GDF8/GDF11等配体可以具有增加的选择性。为了说明,在本文中证明以下这些突变增加经改变的配体结合结构域对GDF11(并且因此,可能地GDF8)相对于对激活素的选择性:K74Y、K74F、K74I、L79D、L79E和D80I。以下突变具有反作用,相对于GDF11增加激活素结合的比率:D54A、K55A、L79A和F82A。可以通过包含“尾部”区或可能地未结构化的接头区以及通过使用K74A突变来提高总体(GDF11和激活素)结合活性。引起配体结合亲和力总体降低的其他突变包括:R40A、E37A、R56A、W78A、D80K、D80R、D80A、D80G、D80F、D80M和D80N。可以组合突变来实现所需效果。例如,许多影响GDF11:激活素结合比率的突变对配体结合具有总体负面影响,并且因此,这些突变可以与通常增加配体结合的突变组合以产生具有配体选择性的经改善的结

合蛋白。在一个示例性实施方案中,GDF阱是ActRIIB多肽,其包含任选地与其他氨基酸取代、添加或缺失组合的L79D或L79E突变。

[0036] 在一些实施方案中,本公开文本的TGF $\beta$ 拮抗剂是可以抑制TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖、特别是抑制下游信号传导的药剂。因此,在一些实施方案中,本公开文本的TGF $\beta$ 拮抗剂是可以抑制一种或多种TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖结合配体[例如,TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和/或TGF $\beta$ 3]的药剂。在一些实施方案中,本公开文本的TGF $\beta$ 拮抗剂是可以抑制TGF $\beta$ 和/或ALK5信号传导途径的一种或多种细胞内介体(例如,Smad)的药剂。此类TGF $\beta$ 拮抗剂药剂包括例如TGF $\beta$ RII多肽以及其变体;抗体、或抗体组合,其抑制一种或多种TGF $\beta$ 配体、ALK5受体、 $\beta$ 聚糖和/或TGF $\beta$ RII受体;多核苷酸、或多核苷酸组合,其抑制一种或多种TGF $\beta$ 配体、ALK5、 $\beta$ 聚糖、TGF $\beta$ RII受体和/或TGF $\beta$ RII和/或ALK5下游信号传导组分(例如,Smad);小分子、或小分子组合,其抑制一种或多种TGF $\beta$ 配体、ALK5、 $\beta$ 聚糖、TGF $\beta$ RII受体和/或TGF $\beta$ RII和/或ALK5下游信号传导组分(例如,Smad);以及其组合。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 1。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂结合至和/或抑制TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。

[0037] 在某些方面中,本公开文本涉及TGF $\beta$ RII多肽、包含所述TGF $\beta$ RII多肽的组合物以及所述TGF $\beta$ RII多肽和组合物的用途。例如,在一些实施方案中,本公开文本的TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:148的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在仍甚至其他实施方案中,TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:150的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施方案中,要根据本文所述的方法和用途使用的药剂是ActRII和TGF $\beta$ 二者的拮抗剂(ActRII:TGF $\beta$ )。ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂是如下药剂,其可以抑制以下中的一种或多种:ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ActRII和ALK4结合配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]和下游信号传导介体(例如,Smad);并且抑制以下中的一种或多种:TGF $\beta$ RII;ALK5; $\beta$ 聚糖;TGF $\beta$ RII、ALK5和 $\beta$ 聚糖结合配体[例如,TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和/或TGF $\beta$ 3]和下游信号传导介体(例如,Smad)。例如,ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂可以是结合至并抑制激活素A和TGF $\beta$ 2二者的双特异性抗体。作为另一个例子,ActRII:TGF $\beta$ 拮抗剂可以是抑制一种或多种Smad,特别是Smad 2和Smad 3的多核苷酸或小分子。

[0039] 如本文所述,ActRII多肽、TGF $\beta$ RII多肽及其变体是同多聚体,例如同二聚体、同三聚体、同四聚体、同五聚体和更高阶同多聚体复合物。在某些优选实施方案中,ActRII多肽和TGF $\beta$ RII多肽是同二聚体。在某些实施方案中,本文所述的ActRII多肽和TGF $\beta$ RII多肽二聚体包含与第二ActRII或TGF $\beta$ RII多肽共价或非共价缔合的第一ActRII或TGF $\beta$ RII多肽,其中第一多肽包含ActRII结构域或TGF $\beta$ RII结构域以及相互作用对(例如,免疫球蛋白的恒定结构域)的第一成员(或第二成员)的氨基酸序列,并且第二多肽包含ActRII多肽或TGF $\beta$ RII多肽以及相互作用对的第二成员(或第一成员)的氨基酸序列。

[0040] 在某些方面中,ActRII多肽和TGF $\beta$ RII多肽(包括其变体)可以是融合蛋白。例如,在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII多肽的ActRII多肽可以是融合蛋白,其包含ActRII多肽结构域或TGF $\beta$ RII多肽结构域以及一个或多个异源(非ActRII或非TGF $\beta$ RII)多肽结构域。在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII多肽的ActRII多肽可以是融合蛋白,其具有衍生自ActRII多肽或TGF $\beta$ RII多肽的氨基酸序列作为一个结构域(例如,ActRII受体、TGF $\beta$ RII受体或其变体的配体结合结构域)以及一个或多个提供期望的特性的异源结构域,所述特性是如经改善的药代动力学、更易纯化、靶向特定组织等。例如,融合蛋白的结构域可以增强以下中的一种或多种:体内稳定性、体内半衰期、摄取/给予、组织定位或分布、蛋白质复合物的形成、融合蛋白的多聚化和/或纯化。任选地,融合蛋白的TGF $\beta$ RII多肽结构域的ActRII多肽结构域直接连接(融合)至一个或多个异源多肽结构域,或者间插序列(如接头)可以定位于TGF $\beta$ RII多肽的ActRII多肽的氨基酸序列与所述一个或多个异源结构域的氨基酸序列之间。在某些实施方案中,ActRII或TGF $\beta$ RII融合蛋白包含定位于异源结构域与TGF $\beta$ RII结构域的ActRII结构域之间的相对未结构化的接头。所述接头可以对应于在ActRIIA或ActRIIB的细胞外结构域C末端的约4-15个氨基酸的未结构化区域(“尾部”),或者其可以是相对不含二级结构的介于3个与15、20、30、50或更多个氨基酸之间的人工序列。接头可以富含甘氨酸和脯氨酸残基,并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列。接头的例子包括但不限于序列TGGG (SEQ ID NO:31)、SGGG (SEQ ID NO:32)、TGGGG (SEQ ID NO:29)、SGGGG (SEQ ID NO:30)、GGGGS (SEQ ID NO:33)、GGGG (SEQ ID NO:28) 和 GGG (SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,ActRII或TGF $\beta$ RII融合蛋白可以包含免疫球蛋白的恒定结构域,包括例如免疫球蛋白的Fc部分。例如,衍生自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM免疫球蛋白的Fc结构域的氨基酸序列。例如,免疫球蛋白结构域的Fc部分可以包含与SEQ ID NO:22-26中的任一个至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。此类免疫球蛋白结构域可以包含一个或多个氨基酸修饰(例如,缺失、添加和/或取代),所述修饰赋予经改变的Fc活性,例如降低一种或多种Fc效应子功能。在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII融合蛋白的ActRII包含如式A-B-C中所述的氨基酸序列。例如,B部分是如本文所述的N末端和C末端截短的ActRII多肽或TGF $\beta$ RII多肽。A部分和C部分可以独立地是零个、一个或超过一个氨基酸,并且A部分和C部分二者对于B都是异源的。A部分和/或C部分可以通过接头序列附接至B部分。在某些实施方案中,TGF $\beta$ RII融合蛋白的ActRII包含前导序列。前导序列可以是天然ActRII或TGF $\beta$ RII前导序列(例如,天然ActRIIA、ActRIIB或TGF $\beta$ RII前导序列)或异源前导序列。在某些实施方案中,前导序列是组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[0041] 如本文所述,已经发现,与相应的ActRIIB和ALK4同二聚体相比,ALK4:ActRIIB异二聚体蛋白质复合物具有不同的配体结合概况/选择性。具体地,ALK4:ActRIIB异二聚体展示出与任一种同二聚体相比增强的与激活素B的结合,保留如用ActRIIB同二聚体所观察到的与激活素A、GDF8和GDF11的强结合,并且展现出显著降低的与BMP9、BMP10和GDF3的结合。具体地,BMP9对ALK4:ActRIIB异二聚体的展示出低至不可观察到的亲和力,而这种配体与ActRIIB同二聚体强烈结合。与ActRIIB同二聚体一样,ALK4:ActRIIB异二聚体保留中等水平的与BMP6的结合。参见图19。这些结果因此证明,与ActRIIB同二聚体相比,ALK4:ActRIIB异二聚体是激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的更具选择性的拮抗剂(抑制剂)。因此,ALK4:ActRIIB异二聚体在这种选择性拮抗作用是有利的某些应用中比ActRIIB同二聚体更有用。例子包括需要保留激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素AC)、GDF8和GDF11中的一种或多种的拮抗性而使BMP9、BMP10和GDF3中的一种或多种的拮抗性降至最低的治疗应用。此外,已经显示ALK4:ActRIIB异二聚体治疗患者的癌症。因此,本公开文本部分地涉及ALK4:ActRIIB异二聚体及其用途,特别是与TGF $\beta$ 拮抗剂组合。虽然不希望受限于特定的作用机制,但是预期,结合至激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素AB和激活素AC)、GDF8和/或GDF11中的至少一种或多种的ALK4:ActRIIB异多聚体以及其变体将是促进在癌症患者中的有益作用的有用药剂。

[0042] 因此,本公开文本提供了包含至少一种ALK4多肽和至少一种ActRIIB多肽的异多聚体复合物(异多聚体)(ALK4:ActRIIB异多聚体)以及其用途。优选地,ALK4多肽包含ALK4受体的配体结合结构域,例如ALK4细胞外结构域的一部分。类似地,ActRIIB多肽通常包含ActRIIB受体的配体结合结构域,例如ActRIIB细胞外结构域的一部分。优选地,此类ALK4和ActRIIB多肽以及其所得的异多聚体是可溶的。

[0043] 在某些方面中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:14的氨基酸34-101至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:15至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:19至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:143至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:145至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:79至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4氨基酸序列。在仍其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:80至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4氨基酸序列。

[0044] 在某些方面中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109至少

70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:2至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:3至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:5至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:6至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:58至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:60至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:63至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:139至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在仍甚至其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:141至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在其他实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含与SEQ ID N0:77至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的ActRIIB氨基酸序列。在某些优选实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体不包含在对应于SEQ ID N0:1的L79的位置处包含酸性氨基酸(例如,E或D)的ActRIIB多肽。

[0045] 如本文所述,ALK4:ActRIIB异多聚体结构包括例如异二聚体、异三聚体、异四聚体、异五聚体和更高阶异多聚体复合物。参见例如,图21-23。在某些优选实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体是异二聚体。在某些方面中,ALK4和/或ActRIIB多肽可以是融合蛋白。ALK4和/或ActRIIB多肽产生为与上文针对本文所述的ActRII和TGF $\beta$ RII融合蛋白所述类似的融合蛋白。

[0046] ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽(包括其变体)可以包含纯化子序列,如表位标签、FLAG标签、多组氨酸序列和GST融合物。任选地,ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽包括选自以下的一个或多个经修饰的氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、缀合至脂质部分的氨基酸和缀合至有机衍生剂的氨基

酸。ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽可以包含至少一种N-连接糖，并且可以包括两种、三种或更多种N-连接糖。此类多肽也可以包含O-连接糖。通常，优选的是，ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽是在哺乳动物细胞系中表达，所述细胞系介导多肽的适当的天然糖基化，以减小患者的不利的免疫应答的可能性。ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽可以在多种以适于患者使用的方式将蛋白质糖基化的细胞系中产生，所述细胞系包括工程化昆虫或酵母细胞、以及哺乳动物细胞如COS细胞、CHO细胞、HEK细胞和NS0细胞。在一些实施方案中，ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽是糖基化的并且具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。在一些实施方案中，本公开文本的ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽在哺乳动物（例如，小鼠或人）中展现出至少4、6、12、24、36、48或72小时的血清半衰期。任选地，ActRII、TGF $\beta$ RII和/或ALK4多肽可以在哺乳动物（例如，小鼠或人）中展现出至少6、8、10、12、14、20、25或30天的血清半衰期。

[0047] 在某些方面中，本公开文本提供了药物制剂，其包含一种或多种ActRII拮抗剂和/或TGF $\beta$ 拮抗剂以及药学上可接受的载体。药物制剂还可以包含一种或多种其他活性剂，如用于治疗或预防如本文所述的障碍或病症[例如，白血病、黑色素瘤（例如，转移性黑色素瘤）、肺癌（例如，鳞状非小细胞肺癌）、肾细胞癌、膀胱癌、间皮瘤（例如，转移性间皮瘤）、头颈癌（例如，头颈鳞状细胞癌）、食管癌、胃癌、结肠直肠癌（例如，结直肠癌）、肝癌（例如，肝细胞癌）、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、多形性胶质母细胞瘤和肉瘤（例如，转移性肉瘤）]的化合物。

[0048] 可以将本文所述的ActRII拮抗剂和/或TGF $\beta$ 拮抗剂中的任一种配制为药物制剂（组合物）。在一些实施方案中，药物制剂包含药学上可接受的载体。药物制剂将优选地不含热原（意味着不含热原至管理用于治疗用途的产品质量的规定所需的程度）。药物制剂还可以包括一种或多种其他化合物，如用于治疗本文所述的障碍/病症的化合物。通常，ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂基本上不含ALK4和/或ActRIIB同多聚体。例如，在一些实施方案中，ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂包含少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%的ALK4同多聚体。在一些实施方案中，ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂包含少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%的ActRIIB同多聚体。在一些实施方案中，ALK4:ActRIIB异多聚体药物制剂包含少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%的ALK4和ActRIIB同多聚体。

[0049] 在某些方面中，本公开文本的TGF $\beta$ 拮抗剂是抗体或抗体组合。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 1。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂是多特异性抗体。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂是双特异性抗体。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体是夫苏木单抗(fresolimumab)。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至TGF $\beta$ RII。在一些实施方案中，结合至TGF $\beta$ RII的TGF $\beta$ 拮抗剂抗体进一步结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、ALK5和 $\beta$ 聚糖中的一种或多种。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至ALK5。在一些实施方案中，结合至ALK5的TGF $\beta$ 拮抗剂抗体进一步结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、

TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII和 $\beta$ 聚糖中的一种或多种。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂抗体结合至 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,结合至 $\beta$ 聚糖的TGF $\beta$ 拮抗剂抗体进一步结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII和ALK5中的一种或多种。在一些实施方案中,特别在多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的情况下,本公开文本的TGF $\beta$ 拮抗剂抗体也是ActRII拮抗剂抗体。因此,在一些实施方案中,结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII、ALK5和 $\beta$ 聚糖中的一种或多种的抗体进一步结合至ActRIIA、ActRIIB、ALK4、激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9中的一种或多种。在一些实施方案中,本公开文本的多特异性抗体结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3和激活素中的一种或多种。在一些实施方案中,本公开文本的多特异性抗体结合至TGF $\beta$ 2和激活素A。

[0050] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂是抗体或抗体组合。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是多特异性抗体。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是双特异性抗体。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体结合至选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体结合激活素A。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体结合至ActRIIA。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体结合至ActRIIB。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体结合至ActRIIA和ActRIIB。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体结合至ALK4。在一些实施方案中,结合至激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9中的一种或多种的ActRII拮抗剂抗体进一步结合至ActRIIA、ActRIIB和ALK4中的一种或多种。在一些实施方案中,特别在多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的情况下,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体也是TGF $\beta$ 拮抗剂抗体。因此,在一些实施方案中,结合至ActRIIA、ActRIIB、ALK4、激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9中的一种或多种的抗体进一步结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII、ALK5和 $\beta$ 聚糖中的一种或多种。

## 附图说明

[0051] 图1示出了人ActRIIB和人ActRIIA的细胞外结构域的比对,其中在本文基于多种ActRIIB和ActRIIA晶体结构的综合分析推断直接接触配体的残基用框指示。

[0052] 图2示出了多种脊椎动物ActRIIB蛋白(SEQ ID NO:100-105)和人ActRIIA(SEQ ID NO:122)的多序列比对以及衍生自所述比对的共有ActRII序列(SEQ ID NO:106)。

[0053] 图3示出了多种脊椎动物ActRIIA蛋白和人ActRIIA(SEQ ID NO:107-114)的多序列比对。

[0054] 图4示出了多种脊椎动物ALK4蛋白和人ALK4(SEQ ID NO:115-121)的多序列比对。

[0055] 图5示出了在CHO细胞中表达的ActRIIA-hFc的纯化。所述蛋白质纯化为单个的界限清晰的峰,如通过粒度分级柱(上图)和考马斯染色SDS-PAGE(下图)(左图:分子量标准品;右图:ActRIIA-hFc)所可视化的。

[0056] 图6示出了ActRIIA-hFc与激活素(上图)和GDF-11(下图)的结合,如通过Biacore<sup>TM</sup>测定所测量的。

[0057] 图7示出了ActRIIB(25-131)-hFc的完整的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:123)。TPA前导序列(残基1-22)和双重截短的ActRIIB细胞外结构域(残基24-131,使用基于SEQ ID NO:1中的天然序列的编号)各自加下划线。突出显示通过测序揭示是成熟融合蛋白

的N末端氨基酸的谷氨酸,其相对于SEQ ID NO:1位于位置25。

[0058] 图8示出了编码ActRIIB(25-131)-hFc的核苷酸序列(编码链显示于上部,SEQ ID NO:124;并且补体显示于下部(3'-5'),SEQ ID NO:125)。编码TPA前导序列(核苷酸1-66)和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸73-396)的序列加下划线。还示出了ActRIIB(25-131)的相应氨基酸序列。

[0059] 图9示出了编码ActRIIB(25-131)-hFc的替代核苷酸序列(编码链显示于上部,SEQ ID NO:126;并且补体显示于下部(3'-5'),SEQ ID NO:127)。这个序列使得初始转化体中的蛋白质表达水平更高,从而使细胞系研发过程更加快速。编码TPA前导序列(核苷酸1-66)和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸73-396)的序列加下划线,并且突出显示ECD的野生型核苷酸序列(参见图8)中的取代。还示出了ActRIIB(25-131)的相应氨基酸序列。

[0060] 图10示出了人TGF $\beta$ 受体II型(hT $\beta$ RII)的B(短)亚型的天然前体(NP\_003233.4;SEQ ID NO:34)的氨基酸序列。实线下划线指示成熟细胞外结构域(ECD)(残基23-159),并且双下划线指示在A(长)亚型中被置换的缬氨酸。虚线下划线表示前导序列(残基1-22)。

[0061] 图11示出了人T $\beta$ RII的A(长)亚型的天然前体(NP\_001020018.1;SEQ ID NO:35)的氨基酸序列。实线下划线指示成熟ECD(残基23-184),并且双下划线指示剪接产生的异亮氨酸取代。虚线下划线表示前导序列(残基1-22)。

[0062] 图12示出了截短的GDF阱ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的完整氨基酸序列(SEQ ID NO:131),包括TPA前导序列(双下划线)、截短的ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131;单下划线)和hFc结构域。在天然序列中的位置79处取代的天冬氨酸加双下划线并突出显示,通过测序揭示是成熟融合蛋白中的N末端残基的谷氨酸也加双下划线并突出显示。

[0063] 图13示出了无前导序列的截短的GDF阱ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的氨基酸序列(SEQ ID NO:132)。截短的ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131)加下划线。在天然序列中的位置79处取代的天冬氨酸加双下划线并突出显示,通过测序揭示是成熟融合蛋白中的N末端残基的谷氨酸也加双下划线并突出显示。

[0064] 图14示出了无前导序列、hFc结构域和接头的截短的GDF阱ActRIIB(L79D 25-131)的氨基酸序列(SEQ ID NO:133)。在天然序列中的位置79处取代的天冬氨酸加下划线并突出显示,通过测序揭示是成熟融合蛋白中的N末端残基的谷氨酸也加下划线并突出显示。

[0065] 图15示出了编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的核苷酸序列。SEQ ID NO:134对应于有义链,并且SEQ ID NO:135对应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)加双下划线,并且截短的ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-396)加单下划线。还示出了ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131)的氨基酸序列。

[0066] 图16示出了编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的替代核苷酸序列。SEQ ID NO:136对应于有义链,并且SEQ ID NO:137对应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)加双下划线,截短的ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-396)加下划线,并且细胞外结构域的野生型核苷酸序列中的取代加双下划线并突出显示。还示出了ActRIIB细胞外结构域

(SEQ ID NO:1中的残基25–131)的氨基酸序列。

[0067] 图17示出了图16中所示替代核苷酸序列(SEQ ID NO:136)的核苷酸76–396(SEQ ID NO:138)。在此处,图16中指示的相同核苷酸取代也加下划线并突出显示。SEQ ID NO:138仅编码具有L79D取代的截短的ActRIIB细胞外结构域(对应于SEQ ID NO:1中的残基25–131),例如ActRIIB(L79D25–131)。

[0068] 图18示出了使用Clustal 2.1进行的来自人IgG同种型的Fc结构域的多序列比对。铰链区域由虚线下划线指示。双下划线指示在IgG1Fc中工程化以促进不对称链配对的位置和关于其他同种型IgG2、IgG3和IgG4的相应位置的例子。

[0069] 图19示出了与ActRIIB–Fc同二聚体和ALK4–Fc同二聚体相比,ALK4–Fc:ActRIIB–Fc异二聚体蛋白质复合物的比较性配体结合数据。对于每种蛋白质复合物,配体按 $k_{off}$ (它是与配体信号传导抑制良好相关的动力学常数)排序,并且以结合亲和力的降序列出(最紧密结合的配体在顶部列出)。在左侧,黄色、红色、绿色和蓝色线指示解离速率常数的量级。黑色实线指示如下配体,所述配体与异二聚体的结合与同二聚体相比增强或不变,而红色划线指示与同二聚体相比显著降低的结合。如所示,ALK4–Fc:ActRIIB–Fc异二聚体展示出与任一种同二聚体相比增强的与激活素B的结合,保留如用ActRIIB–Fc同二聚体所观察到的与激活素A、GDF8和GDF11的强结合,并且展现出显著降低的与BMP9、BMP10和GDF3的结合。与ActRIIB–Fc同二聚体一样,所述异二聚体保留中等水平的与BMP6的结合。

[0070] 图20示出了比较性ALK4–Fc:ActRIIB–Fc异二聚体/ActRIIB–Fc:ActRIIB–Fc同二聚体IC<sub>50</sub>数据,如通过如本文所述的A–204报告基因测定所测定的。ALK4–Fc:ActRIIB–Fc异二聚体与ActRIIB–Fc:ActRIIB–Fc同二聚体类似地抑制激活素A、激活素B、GDF8和GDF11信号传导途径。然而,与ActRIIB–Fc:ActRIIB–Fc同二聚体相比,ALK4–Fc:ActRIIB–Fc异二聚体对BMP9和BMP10信号传导途径的抑制显著降低。这些数据证明与相应的ActRIIB:ActRIIB同二聚体相比,ALK4:ActRIIB异二聚体是激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的更具选择性的拮抗剂。

[0071] 图21A和21B示出了包含I型受体和II型受体多肽的异聚蛋白质复合物的两个示意性例子。图21A描绘了包含一种I型受体融合多肽和一种II型受体融合多肽的异二聚体蛋白质复合物,所述融合多肽可以通过含于每条多肽链内的多聚化结构域共价或非共价地组装。两个已组装的多聚化结构域构成相互作用对,其可以是引导的或非引导的。图21B描绘了异四聚体蛋白质复合物,其包含两种如图21A中所描绘的异二聚体复合物。可以设想更高阶的复合物。

[0072] 图22示出了如下异聚蛋白质复合物的示意性例子,所述异聚蛋白质复合物包含I型受体多肽(指示为“I”)(例如,与来自人或其他物种的ALK4蛋白的细胞外结构域至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽,如本文所述的那些)和II型受体多肽(指示为“II”)(例如,与来自人或其他物种的ActRIIB蛋白的细胞外结构域至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽,如本文所述的那些)。在所说明的实施方案中,I型受体多肽是包含相互作用对的第一成员(“C<sub>1</sub>”)的融合多肽的一部分,并且II型受体多肽是包含相互作用对的第二成员(“C<sub>2</sub>”)的融合多肽的一部分。在每种融合多肽中,接头可以定位于I型或II型受体多肽与相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一和第二成员

可以是引导(不对称)对,意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自我缔合,或者相互作用对可以是非引导的,意味着所述对的成员可以彼此缔合或自我缔合而没有实质的优先性,并且可以具有相同或不同的氨基酸序列。传统的Fc融合蛋白和抗体是非引导相互作用对的例子,而多种工程化Fc结构域被设计为引导(不对称)相互作用对[例如,Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67 (2A) :95–106]。

[0073] 图23A–23D示出了如下异聚蛋白质复合物的示意性例子,所述异聚蛋白质复合物包含ALK4多肽(例如,与来自人或其他物种的ALK4蛋白的细胞外结构域至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽,如本文所述的那些)和ActRIIB多肽(例如,与来自人或其他物种的ActRIIB蛋白的细胞外结构域至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的多肽,如本文所述的那些)。在所说明的实施方案中,ALK4多肽是包含相互作用对的第一成员(“C<sub>1</sub>”)的融合多肽的一部分,并且ActRIIB多肽是包含相互作用对的第二成员(“C<sub>2</sub>”)的融合多肽的一部分。合适的相互作用对包括例如重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、其截短物和变体,如本文所述的那些[例如,Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67 (2A) :95–106]。在每种融合多肽中,接头可以定位于ALK4或ActRIIB多肽与相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一和第二成员可以是非引导的,意味着所述对的成员可以彼此缔合或自我缔合而没有实质的优先性,并且它们可以具有相同或不同的氨基酸序列。参见图23A。可替代地,相互作用对可以是引导(不对称)对,意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自我缔合。参见图23B。可以设想更高阶的复合物。参见图23C和图23D。

[0074] 图24示出了hT<sub>β</sub>RII<sub>短</sub>截短物与其hT<sub>β</sub>RII<sub>长</sub>对应物的N末端比对。存在于hT<sub>β</sub>RII<sub>长</sub>截短物中的25个氨基酸的插入物加下划线。注意,剪接过程引起短亚型中侧接插入位点的缬氨酸被长亚型中的异亮氨酸置换。加框序列表示前导序列。

## 具体实施方式

[0075] 1. 概述

[0076] TGF<sub>β</sub>超家族包括超过30种分泌因子,包括TGF<sub>β</sub>、激活素、nodal、骨形态发生蛋白(BMP)、生长分化因子(GDF)和抗苗勒管激素(AMH)[Weiss等人(2013)Developmental Biology, 2(1) :47–63]。在脊椎动物和无脊椎动物中均发现的所述超家族的成员在各种组织中普遍表达并在动物的一生中的发育的最早阶段过程中起作用。实际上,TGF<sub>β</sub>超家族蛋白是干细胞自我更新、原肠胚形成、分化、器官形态发生和成年组织内稳态的关键介体。与这种遍在活性一致,异常TGF<sub>β</sub>超家族信号传导与广泛范围的人类病理相关。

[0077] TGF<sub>β</sub>超家族的配体共享相同的二聚体结构,其中一个单体的中心3-1/2转角螺旋抵靠另一单体的β链形成的凹面包装。大多数TGF<sub>β</sub>家族成员通过分子间二硫键进一步稳定。这种二硫键横穿另外两个二硫键形成的环,产生被称为‘半胱氨酸结’的基序[Lin等人(2006)Reproduction 132:179–190; 和Hinck等人(2012)FEBS Letters 586:1860–1870]。

[0078] TGF<sub>β</sub>超家族信号传导是由I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合物介导,所述激酶受体在配体刺激后磷酸化并激活下游SMAD蛋白(例如,SMAD蛋白1、2、3、5和8)[Massagué(2000)Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169–178]。这些I型和II型受体是跨膜蛋白,其由具有富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸

酸激酶特异性的细胞质结构域构成。通常, I型受体介导细胞内信号传导, 而II型受体是结合TGF $\beta$ 超家族配体所需要的。I型和II型受体在配体结合后形成稳定的复合物, 从而导致II型受体对I型受体的磷酸化。

[0079] TGF $\beta$ 家族可以基于其所结合的I型受体和其所激活的Smad蛋白分为两个系统发育分支。一个分支是最近进化的分支, 其包括例如TGF $\beta$ 、激活素、GDF8、GDF9、GDF11、BMP3和nodal, 它们通过激活Smad 2和Smad 3的I型受体传导信号[Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860–1870]。另一个分支包含所述超家族的更远相关的蛋白质, 并且包括例如BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF1、GDF5、GDF6和GDF7, 它们通过Smad 1、Smad 5和Smad 8传导信号。

[0080] TGF $\beta$ 亚型是TGF $\beta$ 超家族的创始成员, 其中在哺乳动物中存在3种已知亚型, 命名为TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3。成熟的生物活性TGF $\beta$ 配体起同二聚体的作用并且主要通过I型受体ALK5传导信号, 但是还已经发现其另外通过内皮细胞中的ALK1传导信号[Goumans等人(2003) Mol Cell 12 (4) :817–828]。TGF $\beta$ 1是最丰富并且遍在表达的亚型。已知TGF $\beta$ 1在伤口愈合中具有重要作用, 并且表达组成型活性TGF $\beta$ 1转基因的小鼠发生纤维化[Clouthier等人(1997) J Clin. Invest. 100 (11) :2697–2713]。TGF $\beta$ 1表达首次描述于人胶质母细胞瘤细胞中, 并且出现于胚胎神经系统的神经元和星形胶质细胞中。TGF $\beta$ 3最初是从人横纹肌肉瘤细胞系分离, 并且后来发现于肺腺癌和肾癌细胞系中。已知TGF $\beta$ 3对于膀胱和肺形态发生是重要的[Kubiczkova等人(2012) Journal of Translational Medicine 10:183]。

[0081] 激活素是TGF $\beta$ 超家族的成员, 并且最初是作为促卵泡激素的调节剂发现的, 但是随后已经表征了多种生殖和非生殖作用。有三种主要的激活素形式(A、B和AB), 它们是两个密切相关的 $\beta$ 亚基的同二聚体/异二聚体(分别为 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$ )。人类基因组还编码主要在肝脏中表达的激活素C和激活素E, 并且含有 $\beta_C$ 或 $\beta_E$ 的异二聚体形式也是已知的。在TGF $\beta$ 超家族中, 激活素是独特并且多功能的因子, 其可以刺激卵巢和胎盘细胞中的激素产生, 支持神经元细胞存活, 根据细胞类型积极地或消极地影响细胞周期进展, 并且至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层分化[DePaolo等人(1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500–512; Dyson等人(1997) Curr Biol. 7:81–84; 和Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953–963]。在若干种组织中, 激活素信号传导受到其相关异二聚体抑制素的拮抗。例如, 在促卵泡激素(FSH)从垂体的分泌的调节中, 激活素促进FSH合成和分泌, 而抑制素减少FSH合成和分泌。可以调节激活素生物活性和/或结合至激活素结合的其他蛋白质包括卵泡抑素(FS)、卵泡抑素相关蛋白(FSRP, 也称为FLRG或FSTL3)和 $\alpha_2$ -巨球蛋白。

[0082] 如本文所述, 结合至“激活素A”的药剂是特异地结合至 $\beta_A$ 亚基的药剂, 无论是在分离的 $\beta_A$ 亚基的背景下还是作为二聚体复合物(例如,  $\beta_A\beta_A$ 同二聚体或 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)。在异二聚体复合物(例如,  $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)的情况下, 结合至“激活素A”的药剂对存在于 $\beta_A$ 亚基内的表位具有特异性, 但是不结合至存在于复合物的非 $\beta_A$ 亚基(例如, 复合物的 $\beta_B$ 亚基)内的表位。类似地, 本文所公开的拮抗(抑制)“激活素A”的药剂是抑制如由 $\beta_A$ 亚基介导的一种或多种活性的药剂, 无论是在分离的 $\beta_A$ 亚基的背景下还是作为二聚体复合物(例如,  $\beta_A\beta_A$ 同二聚体或 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)。在 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体的情况下, 抑制“激活素A”的药剂是特异地抑制 $\beta_A$ 亚基的一种或多种活性而不抑制复合物的非 $\beta_A$ 亚基(例如, 复合物的 $\beta_B$ 亚基)的活性的药剂。这个原理也适用于结合至和/或抑制“激活素B”、“激活素C”和“激活素E”的药剂。本文所公开

的拮抗“激活素AB”的药剂是抑制如由 $\beta_A$ 亚基介导的一种或多种活性和如由 $\beta_B$ 亚基介导的一种或多种活性的药剂。

[0083] BMP和GDF一起形成半胱氨酸结细胞因子的家族,所述细胞因子共享TGF $\beta$ 超家族的特征性折叠[Rider等人(2010)Biochem J.,429 (1):1-12]。这个家族包括例如BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP2a、BMP3、BMP3b(也称为GDF10)、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8、BMP8a、BMP8b、BMP9(也称为GDF2)、BMP10、BMP11(也称为GDF11)、BMP12(也称为GDF7)、BMP13(也称为GDF6)、BMP14(也称为GDF5)、BMP15、GDF1、GDF3(也称为VGR2)、GDF8(也称为肌生成抑制蛋白)、GDF9、GDF15和生物皮肤生长因子(decapentaplegic)。除了诱导骨形成的能力(这赋予了BMP的名称)之外,BMP/GDF在广泛范围的组织的发育中展示出形态发生活性。BMP/GDF同二聚体和异二聚体与I型和II型受体二聚体的组合相互作用以产生多种可能的信号传导复合物,从而导致两组竞争的SMAD转录因子之一的激活。BMP/GDF具有高度特异性且局限性的功能。这些功能通过许多方式进行调节,包括BMP/GDF表达的发育限制和通过分泌以高亲和力结合至细胞因子的几种特异性BMP拮抗剂蛋白。奇怪的是,许多这些拮抗剂类似于TGF $\beta$ 超家族配体。

[0084] 部分地,本文所呈现的数据证明,ActRII拮抗剂(抑制剂)和TGF $\beta$ 拮抗剂可以单独或组合用于治疗癌症。具体地,显示单独用ActRIIA多肽、ActRIIB多肽或泛特异性TGF $\beta$ 抗体治疗在癌症模型中降低肿瘤负担并延长存活时间。此外,显示与单独使用任一种药剂所观察到的效果相比,与TGF $\beta$ 拮抗剂组合的ActRII拮抗剂可以用于协同地提高抗肿瘤活性。虽然数据指示,与抑制TGF $\beta$ 信号传导相关的抗肿瘤作用是由于TGF $\beta$ 2拮抗性所致,但是本文中已经显示,TGF $\beta$ 的所有三种亚型(TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3)的抑制剂具有抗肿瘤活性。因此,虽然在许多实施方案中优选地要根据本公开文本的方法和用途使用的TGF $\beta$ 拮抗剂抑制TGF $\beta$ 2,但是预期抑制TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3的TGF $\beta$ 拮抗剂将也可用于促进抗肿瘤反应。

[0085] 因此,本公开文本部分地提供了单独地或与一种或多种支持疗法和/或其他活性剂组合地使用ActRII拮抗剂、TGF $\beta$ 拮抗剂或ActRII拮抗剂与TGF $\beta$ 拮抗剂的组合治疗癌症、特别是治疗或预防癌症的一种或多种并发症(例如,降低肿瘤负担)的方法。另外,数据指示,ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂疗法的功效依赖于免疫系统。因此,部分地,本公开文本涉及以下发现:ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂可以用作免疫治疗药,特别是用于治疗众多的癌症(例如,与免疫抑制和/或免疫耗竭相关的癌症)。与其他已知的免疫-肿瘤学药剂一样,ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂增强患者的免疫应答的能力可以具有超出癌症领域的更广泛的治疗意义。例如,已经提出,免疫增强剂可用于治疗众多的感染性疾病,特别是促进免疫抑制和/或免疫耗竭的病原剂。此类免疫增强剂还可用于加强疫苗(例如,感染性疾病和癌症疫苗)的免疫功效。因此,本公开文本提供了多种ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂,其可以单独或组合用于提高有需要的受试者的免疫应答,治疗癌症,治疗感染性疾病,和/或提高免疫功效,任选地与一种或多种支持疗法和/或其他活性剂组合。

[0086] 本说明书中使用的术语在本公开文本的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中通常具有它们在本领域中的普通含义。某些术语在下文或本说明书的其他地方进行讨论,以向从业者提供关于描述本公开文本的组合物和方法以及如何制备和使用它们的其他指导。术语的任何使用的范围或含义将从使用它的特定上下文中变得清楚。

[0087] 如本文所用的术语“异聚体”或“异多聚体”是指包含至少第一多肽链和第二多肽

链的复合物，其中第二多肽链在氨基酸序列上与第一多肽链相差至少一个氨基酸残基。异聚体可以包含由第一和第二多肽链形成的“异二聚体”，或者可以形成除了第一和第二多肽链之外还存在一条或多条多肽链的更高阶结构。异多聚体的示例性结构包括异二聚体、异三聚体、异四聚体和其他寡聚体结构。异二聚体在本文中命名为X:Y或等同地命名为X-Y，其中X代表第一多肽链，并且Y代表第二多肽链。更高阶异聚体和寡聚体结构在本文中以相应的方式命名。

[0088] 所有语法形式和拼写变体的“同源的”是指具有“共同的进化起源”的两种蛋白质之间的关系，所述蛋白质包括来自相同生物物种中的超家族的蛋白质以及来自不同生物物种的同源蛋白质。此类蛋白质(及其编码核酸)具有如通过其序列相似性所反映的序列同源性，无论是就同一性百分比而言还是根据特定残基或基序和保守位置的存在。然而，在通常的用法中和在本申请中，术语“同源的”在用副词如“高度地”修饰时可以指代序列相似性，并且可以涉及或可以不涉及共同的进化起源。

[0089] 所有语法形式的术语“序列相似性”是指可以共享或可以不共享共同的进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应的程度。

[0090] 将关于参考多肽(或核苷酸)序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在用以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)后，候选序列中与参考多肽(核苷酸)序列中的氨基酸残基(或核酸)相同的氨基酸残基(或核酸)的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对能以本领域技术范围内的多种方式实现，例如使用可公开获得的计算机软件，如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数，包括为了在被比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。然而，为了本文的目的，使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸(核酸)序列同一性值%。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc.编写，并且源代码已经以用户文档提交在美国版权局(U.S. Copyright Office)，华盛顿特区，20559中，其中它在美国版权登记号TXU510087下注册。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech, Inc.公开获得，或者可以从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置，并且不变。

[0091] 所有语法形式的“激动”是指激活蛋白质和/或基因(例如，通过激活或扩增该蛋白质的基因表达或通过诱导无活性蛋白质进入活性状态)或提高蛋白质和/或基因的活性的过程。

[0092] 所有语法形式的“拮抗”是指抑制蛋白质和/或基因(例如，通过抑制或减少该蛋白质的基因表达或通过诱导活性蛋白质进入无活性状态)或降低蛋白质和/或基因的活性的过程。

[0093] 在整个说明书和权利要求书中结合数值使用的术语“约”和“大约”表示本领域技术人员熟悉和可接受的精确度区间。通常，这种精确度区间为±10%。可替代地，并且特别是在生物系统中，术语“约”和“大约”可以意指在给定值的数量级内(优选地≤5倍且更优选地≤2倍)的值。

[0094] 本文所公开的数字范围包括限定所述范围的数字。

[0095] 术语“一个/种(a和an)”包括复数指示物，除非使用所述术语的上下文另有明确规定。

定。术语“一个/种(a或an)”以及术语“一个/种或多个/种(one or more)”和“至少一个/种(at least one)”可以在本文中互换使用。此外,当在本文中使用时,将“和/或”视为对两个或更多个指定特征或组分中的每一者与或不与其他特征或组分的具体公开。因此,在本文如以短语如“A和/或B”使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)以及“B”(单独)。同样地,如以短语如“A、B和/或C”使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0096] 2. ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽和ALK4:ActRIIB异多聚体

[0097] 在某些方面中,本公开文本涉及ActRII多肽及其用途(例如,提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)。如本文所用,术语“ActRII”是指II型激活素受体的家族。这个家族包括激活素受体IIA型(ActRIIA)和激活素受体IIB型(ActRIIB)。在一些方面中,本公开文本涉及包含至少一种ActRIIB多肽和至少一种ALK4多肽的异多聚体(在本文中通常将其称为“ALK4:ActRIIB异多聚体”或“ALK4:ActRIIB异多聚体复合物”)及其用途(例如,提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)。

[0098] 如本文所用,术语“ActRIIB”是指来自任何物种的激活素受体IIB型(ActRIIB)蛋白质的家族以及通过诱变或其他修饰衍生自此类ActRIIB蛋白的变体。本文中对ActRIIB的提及应理解为对任何一种当前鉴定的形式的提及。ActRIIB家族的成员通常是跨膜蛋白,其由包含富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域构成。

[0099] 术语“ActRIIB多肽”包括包含ActRIIB家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽。此类变体ActRIIB多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号W0 2006/012627、W0 2008/097541和W0 2010/151426中,将所述专利申请通过引用以其整体并入本文。本文所述的所有ActRIIB相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人ActRIIB前体蛋白序列(SEQ ID NO:1)的编号,除非另外特别指出。

[0100] 人ActRIIB前体蛋白序列如下:

```

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELE TNQSGLERCE
51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
[0101] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSR
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1)

```

[0102] 信号肽用单下划线指示；细胞外结构域以粗体字指示；并且潜在的内源N-连接糖基化位点用双下划线指示。

[0103] 经加工的细胞外ActRIIB多肽序列如下：

[0104] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR  
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO:2)。

[0105] 在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“SGR……”序列的蛋白质。细胞外结构域的C末端“尾部”由单下划线指示。缺失“尾部”的序列(Δ 15序列)如下：

[0106] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR  
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:3)。

[0107] 文献中还报道了在SEQ ID NO:1的位置64处具有丙氨酸(A64)的ActRIIB的形式。参见例如，Hilden等人(1994)Blood, 83 (8): 2163-2170。已经确定，包含具有A64取代的ActRIIB的细胞外结构域的ActRIIB-Fc融合蛋白对激活素和GDF11具有相对较低的亲和力。相比之下，在位置64处具有精氨酸(R64)的相同ActRIIB-Fc融合蛋白对激活素和GDF11具有在低纳摩尔至高皮摩尔范围内的亲和力。因此，具有R64的序列用作本公开文本中人ActRIIB的“野生型”参考序列。

[0108] 在位置64处具有丙氨酸的ActRIIB的形式如下：

[0109]

```

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLERCE
51 GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWC RG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSR
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 4)

```

[0110] 信号肽由单下划线指示，并且细胞外结构域由粗体字指示。

[0111] 替代A64形式的经加工的细胞外ActRIIB多肽序列如下：

[0112] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR  
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO:5)

[0113] 在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“SGR……”序列的蛋白质。细胞外结构域的C末端“尾部”由单下划线指示。缺失“尾部”的序列(Δ 15序列)如下：

[0114] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDR  
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:6)

[0115] 编码人ActRIIB前体蛋白的核酸序列如下所示 (SEQ ID NO:7) , 表示Genbank参考序列NM\_001106.3的核苷酸25-1560, 其编码ActRIIB前体的氨基酸1-513。如所示的序列提供了位置64处的精氨酸, 并且可以被修饰为替代地提供丙氨酸。信号序列加下划线。

[0116]

1       ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC  
51      CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG  
101     CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA  
151     GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC  
201     TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT  
251     GCTACGATAG GCAGGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC  
301     TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTGCC  
351     AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA  
401     CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTCC  
451     CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA  
501     CGGTCAATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC  
551     TGGTGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC  
601     TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA  
651     GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT  
701     TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAAC TGCTACAGTT CATTGCTGCC  
751     GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT  
801     CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT  
851     GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTACGAGG CCTCTCATAC  
901     CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT  
951     TGCCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA  
1001    CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA  
1051    CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC

[0117]

1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCCTGCGCA  
 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC  
 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA  
 1251 GATTGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA  
 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG  
 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC  
 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTGGAGGT  
 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC  
 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)

[0118] 编码经加工的细胞外人ActRIIB多肽的核酸序列如下(SEQ ID NO:8)。如所示的序列提供了位置64处的精氨酸,并且可以被修饰为替代地提供丙氨酸。

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG  
 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC  
 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGAACAG CTCTGGCACC  
 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA  
 [0119] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT  
 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT  
 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC  
 (SEQ ID NO: 8)

[0120] 人ActRIIB细胞外结构域和人ActRIIA细胞外结构域的氨基酸序列的比对示于图1中。这个比对指示了被认为直接接触ActRII配体的两种受体内的氨基酸残基。例如,复合ActRII结构指示ActRIIB-配体结合口袋部分地由残基Y31、N33、N35、L38至T41、E47、E50、Q53至K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78至N83、Y85、R87、A92以及E94至F101定义。在这些位置处,预期保守突变将是耐受的。

[0121] 另外,ActRIIB在脊椎动物中是良好保守的,其中大段的细胞外结构域完全保守。例如,图2描绘了与多种ActRIIB直系同源物相比的人ActRIIB细胞外结构域的多序列比对。结合至ActRIIB的许多配体也是高度保守的。因此,根据这些比对,可以预测配体结合结构域内对于正常的ActRIIB-配体结合活性重要的关键氨基酸位置,并且预测可能耐受取代而不显著改变正常的ActRIIB-配体结合活性的氨基酸位置。因此,根据本发明公开的方法有用的活性人ActRIIB变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ActRIIB的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸,或者可以包括类似于人或其他脊椎动物序列中的残基的残基。不意在是限制性的,以下例子说明了定义活性ActRIIB变体的这种方法。人细胞外结构域(SEQ ID NO:103)中的L46是爪蟾(Xenopus)ActRIIB(SEQ ID NO:105)中的缬氨酸,并且因此这个

位置可以改变，并且任选地可以改变为另一种疏水性残基(如V、I或F)或非极性残基(如A)。人细胞外结构域中的E52是爪蟾中的K，指示这个位点可以耐受众多的变化，包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能地A。人细胞外结构域中的T93是爪蟾中的K，指示在这个位置耐受宽结构变异，且偏好极性残基，如S、K、R、E、D、H、G、P、G和Y。人细胞外结构域中的F108是爪蟾中的Y，并且因此应耐受Y或其他疏水性基团，如I、V或L。人细胞外结构域中的E111是爪蟾中的K，指示在这个位置将耐受带电荷的残基(包括D、R、K和H)以及Q和N。人细胞外结构域中的R112是爪蟾中的K，指示在这个位置耐受碱性残基，包括R和H。在人细胞外结构域中的位置119处的A相对较不保守，并且在啮齿类动物中作为P出现且在爪蟾中作为V出现，由此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0122] 此外，本领域中已经在结构和功能特征方面、特别是关于配体结合表征了ActRII蛋白[Attisano等人(1992)Cell 68(1):97-108;Greenwald等人(1999)Nature Structural Biology 6(1):18-22;Allendorph等人(2006)PNAS 103(20):7643-7648;Thompson等人(2003)The EMBO Journal 22(7):1555-1566;以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的教导之外，这些参考文献充分地提供了关于如何产生保留一种或多种正常活性(例如，配体结合活性)的ActRIIB变体的指导。

[0123] 例如，称为三指毒素折叠的定义性结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的，并且是由位于每种单体受体的细胞外结构域内不同位置处的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;和Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此，如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ActRIIB的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:1(ActRIIB前体)的位置29-109。侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较不有序的氨基酸可以在N末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个残基，和/或在C末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基，而不必改变配体结合。用于N末端和/或C末端截短的示例性ActRIIB细胞外结构域包括SEQ ID NO:2、3、5和6。

[0124] Attisano等人表明ActRIIB的细胞外结构域的C末端的脯氨酸结的缺失降低了受体对激活素的亲和力。含有本发明SEQ ID NO:1的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合蛋白“ActRIIB(20-119)-Fc”相对于ActRIIB(20-134)-Fc具有降低的与GDF11和激活素的结合，所述ActRIIB(20-134)-Fc包括脯氨酸结区域和完整的近膜结构域(参见例如，美国专利号7,842,663)。然而，ActRIIB(20-129)-Fc蛋白相对于野生型保留类似但略微降低的活性，即使脯氨酸结区域被破坏。

[0125] 因此，在氨基酸134、133、132、131、130和129(关于SEQ ID NO:1)处停止的ActRIIB细胞外结构域预期全部都具活性，但在134或133处停止的构建体可能是最具活性的。类似地，预期在残基129-134(关于SEQ ID NO:1)中任何一个处的突变不大幅改变配体结合亲和力。支持这一点的是，本领域已知，P129和P130(关于SEQ ID NO:1)的突变基本上不降低配体结合。因此，本公开文本的ActRIIB多肽可以早在氨基酸109(最终半胱氨酸)处结束，然而，预期在109和119处或在109与119之间(例如，109、110、111、112、113、114、115、116、117、118或119)结束的形式具有降低的配体结合。氨基酸119(关于本发明SEQ ID NO:1)较不保守，并且因此容易改变或截短。在128(关于SEQ ID NO:1)处或稍后结束的ActRIIB多肽和基于ActRIIB的GDF阱应保留配体结合活性。关于SEQ ID NO:1在119和127处或在119与127之

间(例如,119、120、121、122、123、124、125、126或127)结束的ActRIIB多肽和基于ActRIIB的GDF阱将具有中等结合活性。根据临床或实验设置,可能需要使用这些形式中的任何一种。

[0126] 在ActRIIB的N末端,预期在氨基酸29(关于SEQ ID N0:1)处或之前开始的蛋白质将保留配体结合活性。氨基酸29表示初始半胱氨酸。在位置24(关于SEQ ID N0:1)处的丙氨酸至天冬酰胺的突变引入N-连接糖基化序列而基本上不影响配体结合[美国专利号7,842,663]。这证实了在信号切割肽与半胱氨酸交联区域之间的对应于氨基酸20-29的区域中的突变是良好耐受的。具体地,在位置20、21、22、23和24(关于SEQ ID N0:1)处开始的ActRIIB多肽和基于ActRIIB的GDF阱应保留一般配体结合活性,并且预期在位置25、26、27、28和29(关于SEQ ID N0:1)处开始的ActRIIB多肽和基于ActRIIB的GDF阱也保留配体结合活性。例如美国专利号7,842,663已经证明在22、23、24或25处开始的ActRIIB构建体惊人地具有最大活性。

[0127] 总之,ActRIIB的活性部分(例如,配体结合部分)的通式包含SEQ ID N0:1的氨基酸29-109。因此,ActRIIB多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID N0:1的氨基酸20-29中任一个的残基处开始(例如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID N0:1的氨基酸109-134中任一个的位置处结束(例如,在氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任一个处结束)的ActRIIB的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。其他例子包括如下多肽,所述多肽在来自SEQ ID N0:1的20-29(例如,位置20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个)或21-29(例如,位置21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个)的位置处开始,并且在来自SEQ ID N0:1的119-134(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任一个)、119-133(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133中的任一个)、129-134(例如,位置129、130、131、132、133或134中的任一个)或129-133(例如,位置129、130、131、132或133中的任一个)的位置处结束。其他例子包括如下构建体,所述构建体在来自SEQ ID N0:1的20-24(例如,位置20、21、22、23或24中的任一个)、21-24(例如,位置21、22、23或24中的任一个)或22-25(例如,位置22、23或25中的任一个)的位置处开始,并且在来自SEQ ID N0:1的109-134(例如,位置109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任一个)、119-134(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任一个)或129-134(例如,位置129、130、131、132、133或134中的任一个)的位置处结束。还考虑了这些范围内的变体,特别是包含与SEQ ID N0:1的相应部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成的那些。

[0128] 本文所述的变异能以各种方式组合。在一些实施方案中,ActRIIB变体包含配体结合口袋中的不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守氨基酸变化,任选地在配体结合口袋中的位置40、53、55、74、79和/或82的零个、一个或多个非保守改变。可变性可以特别地良好耐受

的结合口袋外部的位点包括细胞外结构域的氨基和羧基末端(如上所述)以及位置42–46和65–73(关于SEQ ID NO:1)。在位置65处的天冬酰胺至丙氨酸的改变(N65A)似乎不降低R64背景中的配体结合[美国专利号7,842,663]。这种变化可能消除A64背景中N65处的糖基化,因此证明,这个区域中的显著变化可能耐受。虽然R64A变化较不耐受,但是R64K是良好耐受的,并且因此另一种碱性残基如H可以在位置64处耐受[美国专利号7,842,663]。另外,本领域描述的诱变程序的结果指示ActRIIB中存在通常有益于保守的氨基酸位置。关于SEQ ID NO:1,这些位置包括位置80(酸性或疏水性氨基酸)、位置78(疏水性氨基酸,并且特别是色氨酸)、位置37(酸性氨基酸,特别是天冬氨酸或谷氨酸)、位置56(碱性氨基酸)、位置60(疏水性氨基酸,特别是苯丙氨酸或酪氨酸)。因此,本公开文本提供了可以在ActRIIB多肽中保守的氨基酸的框架。可能需要保守的其他位置如下:位置52(酸性氨基酸)、位置55(碱性氨基酸)、位置81(酸性氨基酸)、98(极性或带电荷的氨基酸,特别是E、D、R或K),所有这些位置都是关于SEQ ID NO:1。

[0129] 先前已经证明,将另一N-连接糖基化位点(N-X-S/T)添加至ActRIIB细胞外结构域中是良好耐受的(参见例如,美国专利号7,842,663)。因此,N-X-S/T序列通常可以在本公开文本的ActRIIB多肽中例如图1中定义的配体结合口袋外部的位置处引入。用于引入非内源N-X-S/T序列的特别合适的位点包括氨基酸20–29、20–24、22–25、109–134、120–134或129–134(关于SEQ ID NO:1)。还可以将N-X-S/T序列引入ActRIIB序列与Fc结构域或其他融合组分之间的接头中,以及任选地引入融合组分本身中。可以通过关于预先存在的S或T在正确位置处引入N,或者通过在对应于预先存在的N的位置处引入S或T,毫不费力地引入这个位点。因此,产生N-连接糖基化位点的期望的改变是:A24N、R64N、S67N(可能与N65A改变组合)、E105N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S和R112T(关于SEQ ID NO:1)。由于糖基化提供的保护作用,预测被糖基化的任何S可以改变为T而不产生免疫原性位点。同样,预测被糖基化的任何T可以改变为S。因此,考虑了改变S67T和S44T(关于SEQ ID NO:1)。同样,在A24N变体中,可以使用S26T改变。因此,本公开文本的ActRIIB多肽可以是具有一个或多个如上所述的其他非内源N-连接糖基化共有序列的变体。

[0130] 在某些实施方案中,本公开文本涉及包含至少一种ActRIIB多肽(包括其片段、功能变体和经修饰形式)的ActRII拮抗剂(抑制剂)以及其用途(例如,提高有需要的患者的免疫应答和治疗癌症)。优选地,ActRIIB多肽是可溶的(例如,ActRIIB的细胞外结构域)。在一些实施方案中,ActRIIB多肽拮抗一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]的活性(例如,Smad信号传导)。因此,在一些实施方案中,ActRIIB多肽结合至一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20–29的残基处开始(例如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109–134的位置处结束(例如,在氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任一个处结束)的ActRIIB的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基

酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1的氨基酸29-109至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1的氨基酸29-109至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成,其中对应于SEQ ID N0:1的L79的位置是酸性氨基酸(天然存在的酸性氨基酸D和E或人工酸性氨基酸)。在某些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1的氨基酸25-131至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在某些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1的氨基酸25-131至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成,其中对应于SEQ ID N0:1的L79的位置是酸性氨基酸。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、68、69、70、73、77、78、128、131、132和133中的任何一个的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、68、69、70、73、77、78、128、131、132和133中的任何一个的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成,其中对应于SEQ ID N0:1的L79的位置是酸性氨基酸。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含至少一种ActRIIB多肽,由其组成或基本上由其组成,其中对应于SEQ ID N0:1的L79的位置不是酸性氨基酸(即,不是天然存在的酸性氨基酸D或E或人工酸性氨基酸残基)。

[0131] 在某些实施方案中,本公开文本涉及ActRIIA多肽。如本文所用,术语“ActRIIA”是指来自任何物种的激活素受体IIA型(ActRIIA)蛋白质的家族以及通过诱变或其他修饰衍生自此类ActRIIA蛋白的变体。本文中对ActRIIA的提及应理解为对任何一种当前鉴定的形式的提及。ActRIIA家族的成员通常是跨膜蛋白,其由包含富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域构成。

[0132] 术语“ActRIIA多肽”包括包含ActRIIA家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽。此类变体ActRIIA多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号WO 2006/012627和WO 2007/062188中,将所述专利申请通过引用以其整体并入本文。本文所述的所有ActRIIA相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人ActRIIA前体蛋白序列(SEQ ID N0:9)的编号,除非另外特别指出。

[0133] 人ActRIIA前体蛋白序列是如下:

1 MGAAAKLAFA VFLISCSSGA **ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC**  
51 **YGD**KDKRRHC** FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV**  
101 **YFCCCEGNMC NEKF**SYFPEM** EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI**  
151 AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVAKAR  
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQS**W**Q NEYEVYSLPG MKHENILQFI  
[0134] 251 GAEKRGT**SVD** VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL  
301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG  
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR  
401 CTAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG  
451 MAML**CETIEE** CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQLTNIIT TEDIVTVVTM  
501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 9)

[0135] 信号肽由单下划线指示;细胞外结构域以粗体字指示;并且潜在的内源N-连接糖基化位点由双下划线指示。

[0136] 经加工的细胞外人ActRIIA多肽序列如下:

[0137] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD**KDKRRHC**FATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR  
TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKF**SYFPEM**EVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO:10)

[0138] 细胞外结构域的C末端“尾部”由单下划线指示。缺失“尾部”的序列(△15序列)如下:

[0139] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD**KDKRRHC**FATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR  
TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKF**SYFPEM** (SEQ ID NO:11)

[0140] 编码人ActRIIA前体蛋白的核酸序列如下所示 (SEQ ID NO:12), 如下Genbank参考序列NM\_001616.4的核苷酸159-1700。信号序列加下划线。

[0141]

1 ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GGCGTTGCC GTCTTCTTA TCTCCTGTTC  
51 TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAC TCAGGAGTGT CTTTCTTTA  
101 ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACGTGT TGAAACCGTGT  
151 TATGGTGACA AAGATAAACG GCAGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT  
201 TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA  
251 ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA  
301 TATTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATT  
351 TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACCTC AAATCCAGTT ACACCTAACGC  
401 CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT  
451 GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC  
501 CTACCCTCCT GTACTTGTTC CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCCACCTT  
551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG  
601 GGAAGATTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC  
651 TGTCAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG  
701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT  
751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC  
801 AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG  
851 TCTCTTGAA TGAACGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG  
901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC  
951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAAACAAACC  
1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT TGAGGCTGGC  
1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC  
1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTGA  
1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGAACT GGCTTCTCGC  
1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTGAGGA  
1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTGTGC  
1301 ATAAAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA  
1351 ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA  
1401 AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA  
1451 GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTACACAATG

[0142]

1501 GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO: 12)

[0143] 编码经加工的人ActRIIA多肽的核酸序列如下：

[0144]

```

1      ATACTTGGTA GATCAGAAC TCAGGAGTGT CTTTCTTTA ATGCTAATTG
51     GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACCTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA
101    AAGATAAACG CGGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC
151    ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA
201    CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTGTT
251    GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATT TCCGGAGATG
301    GAAGTCACAC AGCCCACCTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC (SEQ ID
NO:13)

```

[0145] ActRIIA在脊椎动物中是良好保守的，其中大段的细胞外结构域完全保守。例如，图3描绘了与多种ActRIIA直系同源物相比的人ActRIIA细胞外结构域的多序列比对。结合至ActRIIA的许多配体也是高度保守的。因此，根据这些比对，可以预测配体结合结构域内对于正常的ActRIIA-配体结合活性重要的关键氨基酸位置，并且预测可能耐受取代而不显著改变正常的ActRIIA-配体结合活性的氨基酸位置。因此，根据本发明公开的方法有用活性人ActRIIA变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ActRIIA的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸，或者可以包括类似于人或其他脊椎动物序列中的残基的残基。

[0146] 不意在是限制性的，以下例子说明了定义活性ActRIIA变体的这种方法。如图3中所示，人细胞外结构域中的F13是绵羊 (*Ovis aries*) (SEQ ID NO:108)、原鸡 (*Gallus gallus*) (SEQ ID NO:111)、牛 (*Bos Taurus*) (SEQ ID NO:112)、仓鸮 (*Tyto alba*) (SEQ ID NO:113) 和小鼠耳蝠 (*Myotis davidii*) (SEQ ID NO:114) ActRIIA中的Y，指示在这个位置耐受芳香族残基，包括F、W和Y。人细胞外结构域中的Q24是牛ActRIIA中的R，指示在这个位置将耐受带电荷的残基，包括D、R、K、H和E。人细胞外结构域中的S95是原鸡和仓鸮ActRIIA中的F，指示这个位点可以耐受众多的变化，包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能地疏水性残基(如L、I或F)。人细胞外结构域中的E52是绵羊ActRIIA中的D，指示在这个位置耐受酸性残基，包括D和E。人细胞外结构域中的P29相对较不保守，在绵羊ActRIIA中作为S出现且在小鼠耳蝠ActRIIA中作为L出现，因此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0147] 此外，如上文所讨论，本领域中已经在结构/功能特征方面、特别是关于配体结合表征了ActRII蛋白 [Attisano等人 (1992) Cell 68 (1) :97-108; Greenwald等人 (1999) Nature Structural Biology 6 (1) :18-22; Allendorph等人 (2006) PNAS 103 (20):7643-7648; Thompson等人 (2003) The EMBO Journal 22 (7) :1555-1566; 以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的教导之外，这些参考文献充分地提供了关于如何产生保留一种或多种所需活性(例如，配体结合活性)的ActRIIA变体的指导。

[0148] 例如，称为三指毒素折叠的定义性结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的，并且是由位于每种单体受体的细胞外结构域内不同位置处的保守半胱氨酸残基形成

[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;和Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此,如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ActRIIA的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:9(ActRIIA前体)的位置30-110。因此,侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较不有序的氨基酸可以在N末端被截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个残基,并且在C末端被截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基,而不必改变配体结合。示例性ActRIIA细胞外结构域截短物包括SEQ ID NO:10和11。

[0149] 因此,ActRIIA的活性部分(例如,配体结合部分)的通式是包含SEQ ID NO:9的氨基酸30-110、基本上由其组成或由其组成的多肽。因此,ActRIIA多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸21-30中任一个的残基处开始(例如,在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸110-135中任一个的位置处结束(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或135中的任一个处结束)的ActRIIA的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。其他例子包括如下构建体,所述构建体在选自以下的位置处开始:SEQ ID NO:9的21-30(例如,在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、22-30(例如,在氨基酸22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、23-30(例如,在氨基酸23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、24-30(例如,在氨基酸24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始),并且在选自以下的位置处结束:SEQ ID NO:9的111-135(例如,在氨基酸111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、112-135(例如,在氨基酸112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、113-135(例如,在氨基酸113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、120-135(例如,在氨基酸120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、130-135(例如,在氨基酸130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、111-134(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133中的任一个处结束)、111-133(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133中的任一个处结束)、111-132(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130或131中的任一个处结束)或111-131(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130或131中的任一个处结束)。还考虑了这些范围内的变体,特别是包含与SEQ ID NO:9的相应部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成的那些。因此,在一些实施方案中,ActRIIA多肽可以包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110至少70%、75%、

80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的多肽，基本上由所述多肽组成或由所述多肽组成。任选地，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同，并且包含配体结合口袋中的不超过1、2、5、10或15个保守氨基酸变化的多肽。

[0150] 在某些实施方案中,本公开文本涉及包含至少一种ActRIIA多肽(包括其片段、功能变体和经修饰形式)的ActRII拮抗剂(抑制剂)以及其用途(例如,提高有需要的患者的免疫应答和治疗癌症)。优选地,ActRIIA多肽是可溶的(例如,ActRIIA的细胞外结构域)。在一些实施方案中,ActRIIA多肽抑制一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]的(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,ActRIIA多肽结合至一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIA多肽包含与在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸21-30的残基处开始(例如,在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸110-135中任一个的位置处结束(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或135中的任一个处结束)的ActRIIA的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在某些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸21-135至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9、10、11、50、54和57中的任一个的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。

[0151] 在某些方面中，本公开文本涉及GDF阱多肽（也称为“GDF阱”）。在一些实施方案中，本公开文本的GDF阱是变体ActRII多肽（例如，ActRIIA和ActRIIB多肽），其在ActRII多肽（例如，“野生型”或未经修饰的ActRII多肽）的细胞外结构域（也称为配体结合结构域）中包含一个或多个突变（例如，氨基酸添加、缺失、取代及其组合），使得变体ActRII多肽与相应的野生型ActRII多肽相比具有一种或多种经改变的配体结合活性。在优选实施方案中，本公开文本的GDF阱多肽保留至少一种与相应的野生型ActRII多肽类似的活性。例如，优选的GDF阱结合至并抑制（例如，拮抗）GDF11和/或GDF8的功能。在一些实施方案中，本公开文本的GDF阱进一步结合至并抑制TGF $\beta$ 超家族的一种或多种配体。因此，本公开文本提供了GDF阱多肽，其对一种或多种ActRII配体具有改变的结合特异性。

[0152] 为了说明,可以选择一个或多个突变,所述突变提高经改变的配体结合结构域相

对于一种或多种ActRII结合配体对GDF11和/或GDF8的选择性,所述ActRII结合配体是如激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E),特别是激活素A。任选地,经改变的配体结合结构域具有的激活素结合的K<sub>d</sub>与GDF11和/或GDF8结合的K<sub>d</sub>的比率相对于野生型配体结合结构域的所述比率高至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。任选地,经改变的配体结合结构域具有的抑制激活素的IC<sub>50</sub>与抑制GDF11和/或GDF8的IC<sub>50</sub>的比率相对于野生型配体结合结构域高至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。任选地,经改变的配体结合结构域抑制GDF11和/或GDF8的IC<sub>50</sub>比抑制激活素的IC<sub>50</sub>低至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。

[0153] 在某些优选实施方案中,本公开文本的GDF阱被设计为优先结合至GDF11和/或GDF8(也称为肌生成抑制蛋白)。任选地,GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至激活素B。任选地,GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至BMP6。任选地,GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至BMP10。任选地,GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至激活素B和BMP6。在某些实施方案中,例如与野生型ActRII多肽相比,本公开文本的GDF阱对激活素(例如,激活素A、激活素A/B、激活素B、激活素C、激活素E)具有降低的结合亲和力。在某些优选实施方案中,本公开文本的GDF阱多肽对激活素A具有降低的结合亲和力。

[0154] ActRIIB蛋白的氨基酸残基(例如,关于SEQ ID NO:1的E39、K55、Y60、K74、W78、L79、D80和F101)位于ActRIIB配体结合口袋中并且帮助介导与其配体(包括例如激活素A、GDF11和GDF8)的结合。因此,本公开文本提供了GDF阱多肽,其包含ActRIIB受体的经改变的配体结合结构域(例如,GDF8/GDF11结合结构域),所述配体结合结构域包含在那些氨基酸残基处的一个或多个突变。

[0155] 作为具体例子,ActRIIB的配体结合结构域的带正电荷的氨基酸残基Asp(D80)可以突变为不同的氨基酸残基,以产生优先结合至GDF8而不是激活素的GDF阱多肽。优选地,关于SEQ ID NO:1的D80残基变为选自以下的氨基酸残基:不带电荷的氨基酸残基、负氨基酸残基和疏水性氨基酸残基。作为另一具体例子,SEQ ID NO:1的疏水性残基L79可以发生改变以赋予改变的激活素-GDF11/GDF8结合特性。例如,L79P取代降低GDF11结合的程度大于激活素结合。相比之下,用酸性氨基酸置换L79[天冬氨酸或谷氨酸;L79D或L79E取代]在保留GDF11结合亲和力的同时大大降低激活素A结合亲和力。在示例性实施方案中,本文所述的方法利用GDF阱多肽,所述GDF阱多肽是变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:1的位置79的位置处的酸性氨基酸(例如,D或E),任选地与一个或多个其他氨基酸取代、添加或缺失组合。

[0156] 在某些方面中,本公开文本涉及ALK4多肽及其用途(例如,提高有需要的患者的免疫应答和治疗癌症或病原体)。如本文所用,术语“ALK4”是指来自任何物种的激活素受体样激酶-4蛋白的家族以及通过诱变或其他修饰衍生自此类ALK4蛋白的变体。本文中对ALK4的提及应理解为对任何一种当前鉴定的形式的提及。ALK4家族的成员通常是跨膜蛋白,其由具有富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域构成。

[0157] 术语“ALK4多肽”包括包含ALK4家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽。本文所述的所有ALK4相关多肽的氨基酸的编号均基于下文的人ALK4前体蛋白序列(SEQ ID NO:14)的编号,除非

另外特别指出。

[0158] 规范人ALK4前体蛋白序列(NCBI Ref Seq NP\_004293)如下:

[0159]

```

1 MAESAGASSF FPLVVLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD

61 GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS
GHLKEPEHPS

121 MWGPVELVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
MCLSKDKTLQ

181 DLVYDLSTSG SGSGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIIGKGRFGE VWRGRWRGGD
VAVKIFSSRE

241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL
FDYLNRYTVT

301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA
IADLGLAVRH

361 DAVTDTIDIA PNQRVGTKRY MAPEVLDET I NMKHFDSFKC ADIYALGLVY
WEIARRCNSG

421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG
KMMRECWYAN

481 GAARLTALRI KKTSQLSVQ EDVKI (SEQ ID NO: 14)

```

[0160] 信号肽由单下划线指示,并且细胞外结构域以粗体字指示。

[0161] 经加工的细胞外人ALK4多肽序列如下:

[0162] SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGM**EHHVRTCI**PKVELVPAGKPFYCLSSED~~L~~R
NTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO:15)

[0163] 编码ALK4前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:16),其对应于Genbank参考
序列NM\_004302.4的核苷酸78-1592。信号序列加下划线,并且细胞外结构域以粗体字指示。

[0164]

```

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTGCCGGCAGC
GGCGGGTCCGGGCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCC
AACTACACGTGTGAGACAGATGGGCCTGCATGGTTCCATTTCATCTGGATGGATGGAG
CACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGAAAGCCCTACTGC
CTGAGCTCGGAGGACCTGCGAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
TTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCGGTGGAG

```

[0165]

CTGGTAGGCATCATGCCGGCCCGGTGTTCCCTGTCCTCATCATCATTGTTCC  
 GTCATTAACATCATCAGCGTGTCTATCACAAACGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCC  
 TGTGAGATGTGTCCTCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCC  
 GGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCGAACCATGTT  
 GAGATTATTGGCAAGGGTCGGTTGGGAAGTATGGCGGGCCGCTGGAGGGTGGT  
 GCTGTGAAAATATTCTCTCGTGAAGAACGGTCTGGTTCAAGGAAGCAGAGATA  
 ACCAGACGGTCATGCTGCCATGAAAACATCCTGGATTATTGCTGCTGACA  
 ACCTGGACACAGCTGGCTTGTGACTATCATGAGCACGGTCCCTGTTGATT  
 AACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGATGATTAAGCTGGCCTGTGCTGCTAG  
 GCACACCTGCACATGGAGATCGTGGCACCCAAAGGAAGCCTGGAATTGCT  
 AAGTCAAAGAACATTCTGGTAAGAAAAATGGCATGTGTCGCATAGCAG  
 ACCTGGCCTGGCT  
 GTCCGTATGATGCAGTCAGTGCACACCATTGACATTGCCCGAATCAG  
 AGGGTGGGACCAAA  
 CGATACATGGCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAAATATGAA  
 AACACTTGACTCCTTAAA  
 TGTGCTGATATTATGCCCTGGCTTGTATATTGGAGATTGCTCGAAGAT  
 GCAATTCTGGA  
 GGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATTACGACTTAGTGCCCT  
 TGACCCATTGAG  
 GAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCAAAC  
 ATCCCCACTGGTGGCAGAGT  
 TATGAGGCAGTGCAGGTGATGGGAAGATGATGCGAGAGTGTGGT  
 ATGCCAACGGCGCAGCC  
 CGCCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAACCCCT  
 CAGCTCAGCGTCAGGAAGACGTGAAG  
 ATC (SEQ ID NO: 16)

[0166] 编码细胞外ALK4多肽的核酸序列如下：

[0167] TCCGGGCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGCGTGCACCAGCTGC  
 CCTCCAGGCCAACTACACGTG  
 TGAGACAGATGGGCCTGCATGGTTCCATTTC  
 AATCTGGATGGAGTGGAC  
 CCGCCTGCGC  
 AACCTGCATCCCC  
 AAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGAAAGCC  
 TTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGAC  
 CTGCGCAACACCC  
 ACTGCTGCT  
 ACAC  
 TGA  
 CTGCAACAGGATCGACTTGAGGGT  
 GCCAGTGGTCACCTCAAGGAGC  
 CTGAGCACCC  
 GTCCATGTG  
 GGGCCCGGTGGAG (SEQ ID NO:17)

[0168] 人ALK4前体蛋白序列的替代亚型即亚型B (NCBI Ref Seq NP\_064732.3) 如下：

1 MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSEDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH

[0169] 61 LKEPEHPSMW GPVELVGIIA GPVFLLFLII IIVFLVINYH QRVYHNRQRL DMEDPSCEMC  
 121 LSKDKTLQDL VYDLSTSGSG SGLPLFVQRT VARTIVLQEI IGKGRFGEVW RGRWRGGDVA

181 VKIFSSREER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS DYHEH GSLFD  
 241 YLNRYTVTIE GMIKLALSAA SGLAHLHMEI VGTQGKPGIA HRDLKSKNIL VKKNGMCAIA  
 [0170] 301 DLGLAVRHDA VTDTIDIAPN QRVGTKRYMA PEVLD ETINM KHFDSFKCAD IYALGLVYWE  
 361 IARRCNSGGV HEEYQLPYD LVPSDPSIEE MRKVVCDQKL RPNIPNWWQS YEALRVMGKM  
 421 MRECWYANGA ARLTALRIKK TLSQLSVQED VKI (SEQ ID NO: 18)

[0171] 细胞外结构域以粗体字指示。

[0172] 经加工的细胞外ALK4多肽序列如下：

[0173] 1MVSIFNLGDM EHHVRCTCIPK VELVPAGKPF YCLSSEDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH

[0174] 61LKEPEHPSMW GPVE (SEQ ID NO:19)

[0175] 编码ALK4前体蛋白(亚型B)的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:20),其对应于Genbank参考序列NM\_020327.3的核苷酸186-1547。编码细胞外结构域的核苷酸以粗体字指示。

[0176]

```

1 ATGGTTCCA TTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG
51 CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA
101 GCTCGGAGGA CCTGCGAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC
151 AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC
201 GTCCATGTGG GGCCCGBTGG AGCTGGTAGG CATCATGCC GGCCCGGTGT
251 TCCTCCTGTT CCTCATCATC ATCATTGTT TCCTTGTCA TAACTATCAT
301 CAGCGTGTCT ATCACAAACCG CCAGAGACTG GACATGGAAG ATCCCTCATG
351 TGAGATGTGT CTCTCCAAAG ACAAGACGCT CCAGGATCTT GTCTACGATC
401 TCTCCACCTC AGGGTCTGGC TCAGGGTTAC CCCTTTGT CCAGCGCACCA
451 GTGGCCCGAA CCATCGTTT ACAAGAGATT ATTGGCAAGG GTCGGTTGG
501 GGAAGTATGG CGGGGCCGCT GGAGGGGTGG TGATGTGGCT GTGAAAATAT
551 TCTCTTCTCG TGAAGAACGG TCTTGGTTCA GGGAAAGCAGA GATATACCAG
601 ACGGTCAATGC TGCGCCATGA AAACATCCTT GGATTATTG CTGCTGACAA
651 TAAAGATAAT GGCACCTGGA CACAGCTGTG GCTTGTCT GACTATCATG
701 AGCACGGGTC CCTGTTGAT TATCTGAACC GGTACACAGT GACAATTGAG
751 GGGATGATTA AGCTGGCCTT GTCTGCTGCT AGTGGGCTGG CACACCTGCA
801 CATGGAGATC GTGGGCACCC AAGGGAAGCC TGGAATTGCT CATCGAGACT
851 TAAAGTCAA GAACATTCTG GTGAAGAAAA ATGGCATGTG TGCCATAGCA
901 GACCTGGGCC TGGCTGTCCG TCATGATGCA GTCACTGACA CCATTGACAT

```

[0177]

```

951 TGCCCCGAAT CAGAGGGTGG GGACCAAACG ATACATGGCC CCTGAAGTAC
1001 TTGATGAAAC CATTAATATG AAACACTTG ACTCCTTAA ATGTGCTGAT
1051 ATTTATGCC CCGGGCTTGT ATATTGGGAG ATTGCTCGAA GATGCAATTG
1101 TGGAGGAGTC CATGAAGAAT ATCAGCTGCC ATATTACGAC TTAGTGCCTC
1151 CTGACCCTTC CATTGAGGAA ATGCGAAAGG TTGTATGTGA TCAGAAGCTG
1201 CGTCCAACA TCCCCAACTG GTGGCAGAGT TATGAGGCAC TGCGGGTGAT
1251 GGGGAAGATG ATGCGAGAGT GTTGGTATGC CAACGGCGCA GCCCGCCTGA
1301 CGGCCCTGCG CATCAAGAAG ACCCTCTCCC AGCTCAGCGT GCAGGAAGAC
1351 GTGAAGATCT AA (SEQ ID NO: 20)

```

[0178] 编码细胞外ALK4多肽(亚型B)的核酸序列如下：

[0179]

```

1 ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCACCTG
51 CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA
101 GCTCGGAGGA CCTGCGAACAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC
151 AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC
201 GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AGCTGGTAGG (SEQ ID NO: 21)

```

[0180] ALK4在脊椎动物中是良好保守的，其中大段的细胞外结构域完全保守。例如，图4描绘了与多种ALK4直系同源物相比的人ALK4细胞外结构域的多序列比对。结合至ALK4的许多配体也是高度保守的。因此，根据这些比对，可以预测配体结合结构域内对于正常的ALK4-配体结合活性重要的关键氨基酸位置，并且预测可能耐受取代而不显著改变正常的ALK4-配体结合活性的氨基酸位置。因此，根据本发明公开的方法有用的活性人ALK4变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ALK4的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸，或者可以包括类似于人或其他脊椎动物序列中的残基的残基。

[0181] 不意在是限制性的，以下例子说明了定义活性ALK4变体的这种方法。如图4中所示，人ALK4细胞外结构域(SEQ ID NO:115)中的V6是小家鼠(*Mus musculus*)ALK4(SEQ ID NO:119)中的异亮氨酸，并且因此所述位置可以改变，并且任选地可以改变为另一种疏水性残基(如L、I或F)或非极性残基(如A)，如在原鸡ALK4(SEQ ID NO:118)中所观察到的。人细胞外结构域中的E40是原鸡ALK4中的K，指示这个位点可以耐受众多的变化，包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能地非极性残基(如A)。人细胞外结构域中的S15是原鸡ALK4中的D，指示在这个位置耐受宽结构变异，且偏好极性残基，如S、T、R、E、K、H、G、P、G和Y。人细胞外结构域中的E40是原鸡ALK4中的K，指示在这个位置将耐受带电荷的残基(包括D、R、K、H)以及Q和N。人细胞外结构域中的R80是星鼻鼹(*Condylura cristata*)ALK4(SEQ ID NO:116)中的K，指示在这个位置耐受碱性残基，包括R、K和H。人细胞外结构域中的Y77是野猪(*Sus scrofa*)ALK4(SEQ ID NO:120)中的F，指示在这个位置耐受芳香族残基，包括F、W和

Y。人细胞外结构域中的P93相对较不保守，在刺猬(*Erinaceus europaeus*)ALK4 (SEQ ID NO:117)中作为S出现且在原鸡ALK4中作为N出现，因此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0182] 此外，本领域中已经在结构和功能特征方面、特别是关于配体结合表征了ALK4蛋白[例如，Harrison等人(2003) *J Biol Chem* 278 (23) :21129-21135; Romano等人(2012) *J Mol Model* 18 (8) :3617-3625; 和Calvanese等人(2009) 15 (3) :175-183]。除了本文的教导之外，这些参考文献充分地提供了关于如何产生保留一种或多种正常活性(例如，配体结合活性)的ALK4变体的指导。

[0183] 例如，称为三指毒素折叠的定义性结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的，并且是由位于每种单体受体的细胞外结构域内不同位置处的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22; 和Hinck(2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]。因此，如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ALK4的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:14 (ALK4前体)的位置34-101。侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较不有序的氨基酸可以在N末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33个残基，和/或在C末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基，而不必改变配体结合。用于N末端和/或C末端截短的示例性ALK4细胞外结构域包括SEQ ID NO:15和19。

[0184] 因此，ALK4的活性部分(例如，配体结合部分)的通式包含关于SEQ ID NO:14的氨基酸34-101。因此，ALK4多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID NO:14的氨基酸24-34中任一个的残基处开始(例如，在氨基酸24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:14的氨基酸101-126中任一个的位置处结束(例如，在氨基酸101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126中的任一个处结束)的ALK4的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。其他例子包括如下构建体，所述构建体在来自SEQ ID NO:14的24-34(例如，位置24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34中的任一个)、25-34(例如，位置25、26、27、28、29、30、31、32、33或34中的任一个)或26-34(例如，位置26、27、28、29、30、31、32、33或34中的任一个)的位置处开始，并且在来自SEQ ID NO:14的101-126(例如，位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126中的任一个)、102-126(例如，位置102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126中的任一个)、101-125(例如，位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124或125中的任一个)、101-124(例如，位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124中的任一个)、101-121(例如，位置101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120或121中的任一个)、111-126(例如，位置111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125或126中的任一个)、111-125(例如，位置111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124或125中的任一个)、111-124

(例如,位置111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124中的任一个)、121-126(例如,位置121、122、123、124、125或126中的任一个)、121-125(例如,位置121、122、123、124或125中的任一个)、121-124(例如,位置121、122、123或124中的任一个)或124-126(例如,位置124、125或126中的任一个)的位置处结束。还考虑了这些范围内的变体,特别是与SEQ ID N0:14的相应部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的那些。

[0185] 本文所述的变异能以各种方式组合。在一些实施方案中,ALK4变体包含在配体结合口袋中的不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守氨基酸变化。可变性可以特别地良好耐受的结合口袋外部的位点包括细胞外结构域的氨基和羧基末端(如上所述)。

[0186] 在某些实施方案中,本公开文本涉及作为包含至少一种ALK4多肽(包括其片段、功能变体和经修饰形式)的异多聚体的ActRII拮抗剂(抑制剂)以及其用途(例如,提高有需要的患者的免疫应答和治疗癌症)。优选地,ALK4多肽是可溶的(例如,ALK4的细胞外结构域)。在一些实施方案中,包含ALK4多肽的异多聚体抑制一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9](例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,包含ALK4多肽的异多聚体结合至一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。在一些实施方案中,异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述ALK4多肽与关于SEQ ID N0:14的氨基酸34-101至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%、100%相同。在一些实施方案中,异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述ALK4多肽与SEQ ID N0:14、15、18、19、73、74、76、77、79和80的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施方案中,异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述ALK4多肽由至少一种与SEQ ID N0:14、15、18、19、74、76、77、79、80、143和145的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的ALK4多肽组成或基本上由所述ALK4多肽组成。

[0187] 在某些方面中,本公开文本涉及异多聚体复合物,其包含一种或多种ALK4受体多肽(例如,SEQ ID No:14、15、18、19、74、76、77、79、80、143和145及其变体)以及一种或多种ActRIIB受体多肽(例如,SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、68、69、70、71、73、77、78、131、132、133、139、141及其变体),所述异多聚体复合物在本文中通常被称为“ALK4:ActRIIB异多聚体复合物”或“ALK4:ActRIIB异多聚体”,包括其用途(例如,提高有需要的患者的免疫应答和治疗癌症)。优选地,ALK4:ActRIIB异多聚体是可溶的[例如,异多聚体复合物包含ALK4受体的可溶部分(结构域)和ActRIIB受体的可溶部分(结构域)]。通常,ALK4和ActRIIB的细胞外结构域对应于这些受体的可溶部分。因此,在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含ALK4受体的细胞外结构域和ActRIIB受体的细胞外结构域。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体抑制一种或多种TGF $\beta$ 超聚体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9](例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体结合至一种或多种TGF $\beta$ 超家族配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、

活素E)、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述ALK4多肽包含与SEQ ID N0:14、15、18、19、74、76、77、79、80、143和145的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的ALK4:ActRIIB异多聚体复合物包含至少一种ALK4多肽,所述ALK4多肽包含与在对应于SEQ ID N0:14的氨基酸24-34、25-34或26-34中任一个的残基处开始并且在来自SEQ ID N0:14的101-126、102-126、101-125、101-124、101-121、111-126、111-125、111-124、121-126、121-125、121-124或124-126的位置处结束的ALK4的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成,由所述序列组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述ALK4多肽包含与关于SEQ ID N0:14的氨基酸34-101至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成,由所述序列组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、68、69、70、71、73、77、78、131、132、133、139、141中的任一个的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成,由所述序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的ALK4:ActRIIB异多聚体复合物包含至少一种ActRIIB多肽,所述ActRIIB多肽包含与在对应于氨基酸20-29、20-24、21-24、22-25或21-29中任一个的残基处开始并且在来自SEQ ID N0:1的109-134、119-134、119-133、129-134或129-133的位置处结束的ActRIIB的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成,由所述序列组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1的氨基酸29-109至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成,由所述序列组成。在一些实施方案中,ALK4:ActRIIB异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽,所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID N0:1的氨基酸25-131至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成,由所述序列组成。在某些实施方案中,本公开文本的ALK4:ActRIIB异多聚体复合物包含至少一种ActRIIB多肽,其中对应于SEQ ID N0:1的L79的位置不是酸性氨基酸(即,不是天然存在的D或E氨基酸残基或人工酸性氨基酸残基)。本公开文本的ALK4:ActRIIB异多聚体包括例如异二聚体、异三聚体、异四聚体和其他更高阶寡聚体结构。参见例如,图21-23。在某些优选实施方案中,本公开文本的异多聚体复合物是ALK4:ActRIIB异二聚体。

[0188] 天然存在的TGF $\beta$ RII蛋白是跨膜蛋白,其中所述蛋白质的一部分定位于细胞外部(细胞外部分),并且所述蛋白质的一部分定位于细胞内部(细胞内部分)。本公开文本的方面涵盖变体TGF $\beta$ RII多肽,其包含细胞外结构域内的突变和/或TGF $\beta$ RII的细胞外结构域的截短部分。如上所述,人TGF $\beta$ RII以至少两种亚型天然地出现:A(长)和B(短),所述亚型是通

过细胞外结构域(ECD)中的可变剪接来产生(图11和10以及SEQ ID NO:35和34)。SEQ ID NO:148对应于SEQ ID NO:35的残基23-184,描绘了TGF $\beta$ RII的长亚型的天然全长细胞外结构域。除非另外说明,否则基于TGF $\beta$ RII短和长亚型的变体的氨基酸位置编号分别是指在天然前体SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35中的相应位置。

[0189] 在某些实施方案中,本公开文本提供了变体TGF $\beta$ RII多肽。本公开文本的TGF $\beta$ RII多肽可以结合至TGF $\beta$ 超家族成员(例如但不限于TGF $\beta$ 1或TGF $\beta$ 3)并抑制所述成员的功能。TGF $\beta$ RII多肽可以包括如下多肽,其由与天然存在的TGF $\beta$ RII多肽的截短的ECD结构域至少80%相同,并且任选地至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列,所述ECD结构域的C末端存在于SEQ ID NO:34的氨基酸153-159的任一个(例如,153、154、155、156、157、158或159)处。TGF $\beta$ RII多肽可以包括如下多肽,其由与天然存在的TGF $\beta$ RII多肽的截短的ECD结构域至少80%相同,并且任选地至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列,所述ECD结构域的C末端存在于SEQ ID NO:35的氨基酸178-184的任一个(例如,178、179、180、181、182、183或184)处。任选地,TGF $\beta$ RII多肽不包括来自SEQ ID NO:34的氨基酸160-567组成的序列或来自SEQ ID NO:35的氨基酸185-592组成的序列的超过5个连续氨基酸,或超过10、20、30、40、50、52、60、70、80、90、100、150或200个或更多个连续氨基酸。未经加工的TGF $\beta$ RII多肽可以包括或不包括任何信号序列、以及位于信号序列N末端的任何序列。如本文所详述,成熟的(经加工的)TGF $\beta$ RII多肽的N末端可以存在于SEQ ID NO:34的氨基酸23-35或SEQ ID NO:35的氨基酸23-60中的任一个处。本领域技术人员应理解,基于TGF $\beta$ RII的长亚型的相应变体将包括编码25个氨基酸的插入物以及在所述插入物C末端的侧接位置处的保守Val-Ile取代的核苷酸序列。因此,TGF $\beta$ RII多肽可以包括TGF $\beta$ RII多肽(包括短亚型和长亚型二者)、其变体(包括在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸23-159或SEQ ID NO:35的氨基酸23-184的序列中包含例如不超过2、3、4、5、10、15、20、25、30或35个氨基酸取代的变体)、其片段和包含前述任一种的融合蛋白的分离的细胞外部分,但是在每种情况下优选地,前述TGF $\beta$ RII多肽中的任一种将保留对TGF $\beta$ 1或TGF $\beta$ 3中至少一种的基本亲和力。通常,TGF $\beta$ RII多肽将被设计为在生物学相关的温度、pH水平和渗透压下在水溶液中可溶。

[0190] 总之,TGF $\beta$ RII多肽的活性部分可以包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列23-153、23-154、23-155、23-156、23-157或23-158,以及这些序列的在SEQ ID NO:34的氨基酸24-35中的任一个处开始的变体。类似地,TGF $\beta$ RII多肽的活性部分可以包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列23-178、23-179、23-180、23-181、23-182或23-183,以及这些序列的在SEQ ID NO:35的氨基酸24-60中的任一个处开始的变体。示例性TGF $\beta$ RII多肽包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列29-159、35-159、23-153、29-153和35-153或SEQ ID NO:35的氨基酸序列29-184、60-184、23-178、29-178和60-178。还考虑了这些范围内的变体,特别是与SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的相应部分具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的那些。可以选择不包括由SEQ ID NO:34的氨基酸160-567或SEQ ID NO:35的氨基酸185-592组成的序列的TGF $\beta$ RII多肽。

[0191] TGF $\beta$ RII多肽可以在N末端另外包括多个前导序列中的任一个。这个序列将允许在真核系统中表达所述肽并使其靶向分泌途径。参见例如,Ernst等人,美国专利号5,082,783

(1992)。可替代地,天然TGF $\beta$ RII信号序列可以用于实现从细胞挤出。可能的前导序列包括天然前导序列、组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列和蜜蜂蜂毒肽前导序列。信号肽的加工可以根据所选前导序列、所用细胞类型和培养条件以及其他变量而变,并且因此成熟TGF $\beta$ RII多肽的实际N末端开始位点可以在N末端或C末端方向上移动1、2、3、4或5个氨基酸。TGF $\beta$ RII-Fc融合蛋白的例子包括SEQ ID NO:148和150,如本文所示,且TGF $\beta$ RII多肽部分加下划线。本领域技术人员应理解,基于TGF $\beta$ RII的长亚型的相应变体将包括25个氨基酸的插入物以及在所述插入物C末端的侧接位置处的保守Val-Ile取代。在某些方面中,本公开文本涉及TGF $\beta$ RII多肽,所述TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:150的氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,以及其根据本文所述的方法的用途。在某些方面中,本公开文本涉及TGF $\beta$ RII多肽,所述TGF $\beta$ RII多肽包含与SEQ ID NO:148的氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,以及其根据本文所述的方法的用途。在某些方面中,本公开文本涉及TGF $\beta$ RII多肽,所述TGF $\beta$ RII多肽包含与在SEQ ID NO:148的氨基酸25-46中的任一个(例如,25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45或46)处开始并且在SEQ ID NO:148的氨基酸170-186中的任一个(例如,170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185或186)处结束的氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,以及其根据本文所述的方法的用途。

[0192] 在一些实施方案中,本公开文本考虑了通过修饰ALK4多肽、ActRII多肽和/或TGF $\beta$ RII多肽的结构来制备功能变体,用于诸如增强治疗功效或稳定性(例如,保质期和对体内蛋白水解降解的抗性)等目的。变体可以通过氨基酸取代、缺失、添加或其组合来产生。例如,合理地预期用异亮氨酸或缬氨酸分离置换亮氨酸、用谷氨酸分离置换天冬氨酸、用丝氨酸分离置换苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地置换氨基酸(例如,保守突变)将不对所得分子的生物活性具有重大影响。保守置换是在它们的侧链中相关的氨基酸的家族内发生的那些。本公开文本的多肽的氨基酸序列中的变化是否产生功能同源物可以通过以下方式容易地确定:评估变体多肽以与野生型多肽类似的方式在细胞中产生反应或结合至一种或多种配体(包括例如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白(neurturin)、阿特敏蛋白(artemin)、普塞芬蛋白(persephin)、MIS和Lefty)的能力。

[0193] 在某些实施方案中,本公开文本考虑了ALK4多肽、ActRII多肽和/或TGF $\beta$ RII多肽的特定突变,以改变多肽的糖基化。可以选择此类突变以引入或消除一个或多个糖基化位点,如O-连接或N-连接糖基化位点。天冬酰胺连接糖基化识别位点通常包含三肽序列天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸(其中“X”是任何氨基酸),所述三肽序列由适当的细胞糖基化酶特异性识别。也可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加或取代至多肽序列来进行改变(对于O-连接糖基化位点)。糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置中的一个或两个处的多种氨基酸取代或缺失(和/或第二位置处的氨基酸缺失)导致经修饰的三肽序列处的非糖基化。增加多肽上碳水化合物部分的数目的另一种手段是通过将糖昔与多

肽进行化学或酶促偶联。根据所用偶联模式,可以将一种或多种糖附接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基基团;(c)游离巯基基团如半胱氨酸的那些;(d)游离羟基基团如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些;(e)芳香族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些;或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。除去多肽上存在的一个或多个碳水化合物部分可以化学地和/或酶促地完成。化学去糖基化可以涉及例如将多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外的大多数或所有糖的切割,同时保持氨基酸序列完整。多肽上的碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用多种内切糖苷酶和外切糖苷酶来实现,如Thotakura等人[Meth. Enzymol. (1987) 138:350]所述。可以根据所用表达系统的类型适当地调节多肽的序列,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞都可以引入可能受肽的氨基酸序列的影响的不同糖基化模式。通常,用于人的本公开文本的ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽和异多聚体可以在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系中表达,如HEK293或CHO细胞系,但是预期其他哺乳动物表达细胞系可是有用的。

[0194] 本公开文本进一步考虑了产生突变体、特别是ALK4、ActRII和/或TGF $\beta$ RII多肽的组合突变体集合以及截短突变体的方法。组合突变体的库尤其可用于鉴定功能活性(例如,TGF $\beta$ 超家族配体结合)ALK4、ActRII和/或TGF $\beta$ RII序列。筛选此类组合文库的目的可以是产生例如具有改变的特性(如改变的药代动力学或改变的配体结合)的多肽变体。下文提供了多种筛选测定,并且此类测定可以用于评价变体。例如,可以针对以下能力筛选ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽和ALK4:ActRIIB异多聚体变体:结合至一种或多种配体(例如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、阿特敏蛋白、普塞芬蛋白、MIS和Lefty),防止TGF $\beta$ 超家族配体与TGF $\beta$ 超家族受体的结合,和/或干扰由配体引起的信号传导。

[0195] 还可以在基于细胞的测定中或在体内测试ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体的活性。例如,可以评估ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体对参与癌细胞中癌症生长的基因的表达的影响。根据需要,这可以在一种或多种重组配体蛋白(例如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、阿特敏蛋白、普塞芬蛋白、MIS和Lefty)的存在下进行,并且可以转染细胞以产生ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体以及任选地TGF $\beta$ 超家族配体。同样,可以将ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体给予小鼠或其他动物,并且可以使用本领域公认的方法评估一个或多个量度,如肌肉形成和强度。类似地,可以在癌细胞中针对对这些细胞的生长的任何影响测试ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体或其变体的活性,例如通过如本文所述的测定以及本领域公知的那些来进行。SMAD反应性报告基因可以在此类细胞系中用于监测对下游信号传导的影响。

[0196] 可以产生组合衍生的变体,相对于参考ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体,所述变体具有提高的选择性或通常增加的效力。此类变体在从重

组DNA构建体表达时可以用于基因治疗方案中。同样,诱变可以产生如下变体,其具有与相应未经修饰的ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体显著不同的细胞内半衰期。例如,可以使经改变的蛋白质对于蛋白水解降解或导致未经修饰的多肽的破坏或以其他方式失活的其他细胞过程更稳定或更不稳定。此类变体和编码它们的基因可以用于通过调节多肽的半衰期来改变多肽复合物水平。例如,短半衰期可以产生更短暂的生物学作用,并且在诱导型表达系统的一部分时,可以允许更严格地控制细胞内的重组多肽复合物水平。在Fc融合蛋白中,可以在接头(如果存在)和/或Fc部分中进行突变以改变ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体的半衰期。

[0197] 组合文库可以借助编码多肽文库的简并基因文库来产生,所述多肽各自包括潜在的ALK4TGF $\beta$ RII和/或ActRII序列的至少一部分。例如,可以将合成寡核苷酸的混合物酶促地连接至基因序列中,使得潜在的ALK4、TGF $\beta$ RII和/或ActRII编码核苷酸序列的简并集合可表达为单独多肽,或者可替代地,可表达为较大融合蛋白的集合(例如,用于噬菌体展示)。

[0198] 有许多方式可以由简并寡核苷酸序列产生潜在的同源物的文库。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,然后可以将合成基因连接至适当的载体中进行表达。简并寡核苷酸的合成是本领域公知的[Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura等人 (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, 编辑AG Walton, Amsterdam: Elsevier 第273–289页; Itakura等人 (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura等人 (1984) Science 198:1056; 和 Ike等人 (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477]。此类技术已经用于其他蛋白质的定向进化[Scott等人, (1990) Science 249:386–390; Roberts等人 (1992) PNAS USA89:2429–2433; Devlin等人 (1990) Science 249:404–406; Cwirla等人, (1990) PNAS USA87:6378–6382; 以及美国专利号:5,223,409、5,198,346 和 5,096,815]。

[0199] 可替代地,其他形式的诱变可以用于产生组合文库。例如,可以通过使用例如以下方式筛选而从文库中产生并分离本公开文本的ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体:丙氨酸扫描诱变[Ruf等人 (1994) Biochemistry 33:1565–1572; Wang等人 (1994) J. Biol. Chem. 269:3095–3099; Balint等人 (1993) Gene 137:109–118; Grodberg等人 (1993) Eur. J. Biochem. 218:597–601; Nagashima等人 (1993) J. Biol. Chem. 268:2888–2892; Lowman等人 (1991) Biochemistry 30:10832–10838; 和 Cunningham等人 (1989) Science 244:1081–1085];通过接头扫描诱变[Gustin等人 (1993) Virology 193:653–660; 和 Brown等人 (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644–2652; McKnight等人 (1982) Science 232:316];通过饱和诱变[Meyers等人, (1986) Science 232:613];通过PCR诱变[Leung等人 (1989) Method Cell Mol. Biol. 1:11–19];或通过随机诱变,包括化学诱变[Miller等人 (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, 冷泉港, 纽约州; 和 Greener等人 (1994) Strategies in Mol. Biol. 7:32–34]。特别是在组合设置中,接头扫描诱变是鉴定ALK4、TGF $\beta$ RII和/或ActRII多肽的截短(生物活性)形式的有吸引力的方法。

[0200] 本领域已知广泛范围的技术用于筛选通过点突变和截短产生的组合文库的基因产物,并且就此而言,所述技术用于筛选具有某种特性的基因产物的cDNA文库。此类技术通

常将能适用于通过ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体的组合诱变产生的基因文库的快速筛选。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆至复制型表达载体中,用所得载体文库转化适当的细胞以及在检测所需活性促进相对容易地分离编码基因(所述基因的产物被检测到)的载体的条件下表达组合基因。优选的测定包括配体(例如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、nodal、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、阿特敏蛋白、普塞芬蛋白、MIS和Lefty)结合测定和/或配体介导的细胞信号传导测定。

[0201] 在某些实施方案中,除了在ALK4、TGF $\beta$ RII和/或ActRII多肽中天然存在的任何修饰以外,ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体可以进一步包含翻译后修饰。此类修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、酯化和酰化。因此,ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体可以包含非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸酯。此类非氨基酸元件对ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4:ActRIIB异多聚体的功能性的影响可以如本文针对其他异多聚体复合物变体所述来测试。当在细胞中通过切割新生形式的多肽产生本公开文本的多肽时,翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和/或功能也可能是重要的。不同细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有用于此类翻译后活性的特定细胞机器和特征机制,并且可以进行选择以确保对ALK4、TGF $\beta$ RII和/或ActRII多肽的正确修饰和加工。

[0202] 在某些方面中,本公开文本的ActRII多肽、TGF $\beta$ RII多肽和/或ALK4多肽是融合蛋白,其包含ActRII多肽(例如,ActRIIA或ActRIIB多肽)、TGF $\beta$ RII或ALK4多肽的至少一部分(结构域)和一个或多个异源部分(结构域)。此类融合结构域的公知的例子包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域以赋予所需特性。例如,一些融合结构域特别可用于通过亲和色谱分离融合蛋白。出于亲和纯化的目的,使用亲和色谱的相关基质,如谷胱甘肽、淀粉酶和镍或钴缀合的树脂。许多此类基质能以“试剂盒”形式获得,如可与(HIS<sub>6</sub>)融合配偶体一起使用的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress™系统(Qiagen)。作为另一个例子,可以选择融合结构域以促进ActRII多肽的检测。此类检测结构域的例子包括多种荧光蛋白(例如,GFP)以及“表位标签”,所述表位标签通常是可获得特异性抗体的短肽序列。可容易获得特异性单克隆抗体的公知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下,融合结构域具有如用于因子Xa或凝血酶的蛋白酶切割位点,其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白并且由此从中释放重组蛋白。然后可以通过后续色谱分离从融合结构域分离所释放的蛋白质。可以选择的其他类型的融合结构域包括多聚化(例如,二聚化、四聚化)结构域和功能结构域(其赋予另一生物学功能),包括例如来自免疫球蛋白的恒定结构域(例如,Fc结构域)。如本文所述,在一些实施方案中,优选的多聚化结构域是经修饰的Fc结构域,其促进不对称配对以形成异多聚体结构(例如,ALK4:ActRIIB异多聚体)。

[0203] 在某些方面中,本公开文本的ActRII多肽、TGF $\beta$ RII多肽和/或ALK4多肽含有一个或多个能够“稳定化”多肽的修饰。“稳定化”意指增加体外半衰期、血清半衰期的任何物质,

不管这是由于破坏减少、肾脏清除率降低还是药剂的其他药代动力学效应所致。例如,此类修饰延长多肽的保质期,延长多肽的循环半衰期,和/或降低多肽的蛋白水解降解。此类稳定化修饰包括但不限于融合蛋白(包括例如包含ActRII多肽、TGF $\beta$ RII多肽或ALK4多肽结构域和稳定剂结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括例如将糖基化位点添加至本公开文本的多肽)和碳水化合物部分的修饰(包括例如从本公开文本的多肽去除碳水化合物部分)。如本文所用,术语“稳定剂结构域”不仅是指在融合蛋白情况下的融合结构域(例如,免疫球蛋白Fc结构域),而且包括非蛋白质修饰如碳水化合物部分或非蛋白质部分如聚乙二醇。在某些优选实施方案中,ActRII多肽、TGF $\beta$ RII多肽和/或ALK4多肽与稳定多肽的异源结构域(“稳定剂”结构域)、优选地提高多肽在体内的稳定性的异源结构域融合。已知具有免疫球蛋白的恒定结构域(例如,Fc结构域)的融合物对广泛范围的蛋白质赋予期望的药代动力学特性。同样,与人血清白蛋白的融合物可以赋予期望的稳定化特性。

[0204] 在一些实施方案中,本公开文本的ALK4、TGF $\beta$ RII和/或ActRII多肽是Fc融合蛋白。可以用于人IgG1的Fc部分(G1Fc)的天然氨基酸序列的例子如下所示(SEQ ID NO:22)。虚线下划线指示铰链区,并且实线下划线指示具有天然存在的变体的位置。部分地,本公开文本提供了如下多肽,其包含与SEQ ID NO:22具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。根据SEQ ID NO:22中所用的编号系统,G1Fc中天然存在的变体将包括E134D和M136L(参见Uniprot P01857)。

[0205]

```
1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51   VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101  VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151  YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201  FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK      (SEQ ID NO: 22)
```

[0206] 任选地,IgG1Fc结构域具有在诸如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434等残基处的一个或多个突变。在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变中的一个或多个(例如,Asp-265突变)的突变型IgG1Fc结构域具有降低的结合至Fc  $\gamma$ 受体的能力。在其他情况下,相对于野生型IgG1Fc结构域,具有这些突变中的一个或多个(例如,Asn-434突变)的突变型Fc结构域具有增加的结合至MHC I类相关Fc受体(FcRN)的能力。

[0207] 可以用于人IgG2的Fc部分(G2Fc)的天然氨基酸序列的例子如下所示(SEQ ID NO:23)。虚线下划线指示铰链区,并且双下划线指示在序列中存在数据库冲突的位置(根据UniProt P01859)。部分地,本公开文本提供了如下多肽,其包含与SEQ ID NO:23具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。

[0208]

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAAVEWESN GQPENNYKTT PPMLSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK      (SEQ ID NO: 23)

```

[0209] 可以用于人IgG3的Fc部分(G3Fc)的氨基酸序列的两个例子如下所示。G3Fc中的铰链区可以是其他Fc链中的最多四倍，并且含有三个相同的15个残基的区段，其前面是相似的17个残基的区段。如下所示的第一G3Fc序列(SEQ ID NO:24)含有由单个15个残基的区段组成的短铰链区，而第二G3Fc序列(SEQ ID NO:25)含有全长铰链区。在每种情况下，虚线下划线指示铰链区，并且实线下划线指示具有天然存在的变体的位置(根据UniProt P01859)。部分地，本公开文本提供了如下多肽，其包含与SEQ ID NO:24或25具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列，基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。

[0210]

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KWYVDGVEVH NAKTKPREEEQ YNSTFRVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK      (SEQ ID NO: 24)

```

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEEQYNS TFRVVSVLTV LHQDWLNNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK      (SEQ ID NO: 25)

```

[0211] 当转化为SEQ ID NO:24中所用的编号系统时，G3Fc中天然存在的变体(例如，参见Uniprot P01860)包括E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y，并且本公开文本提供了包含含有这些变异中的一个或多个的G3Fc结构域的融合蛋白。另外，人免疫球蛋白IgG3基因(IGHG3)显示出以不同铰链长度为特征的结构多态性[参见Uniprot P01859]。具体地，变体WIS缺少大部分V区和所有CH1区。除了通常存在于铰链区中的11之外，它还在位置7处具有额外的链间二硫键。变体ZUC缺少大部分V区、所有CH1区和部分铰链。变体OMM可以代表等位基因形式或另一个 $\gamma$ 链亚类。本公开文本提供了其他融合蛋

白,其包含含有这些变体中的一种或多种的G3Fc结构域。

[0212] 可以用于人IgG4的Fc部分(G4Fc)的天然氨基酸序列的例子如下所示(SEQ ID NO: 26)。虚线下划线指示铰链区。部分地,本公开文本提供了如下多肽,其包含与SEQ ID NO:26具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。

[0213]

```

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK      (SEQ ID NO: 26)

```

[0214] 关于G1Fc序列(SEQ ID NO:22)本文提出了Fc结构域中的多种工程化突变,并且G2Fc、G3Fc和G4Fc中的类似突变可以来源于在图18中它们与G1Fc的比对。由于不相等的铰链长度,基于同种型比对(图18)的类似Fc位置在SEQ ID NO:22、23、24、25和26中具有不同的氨基酸编号。还可以理解,由铰链、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3区组成的免疫球蛋白序列(例如,SEQ ID NO: 22、23、24、25和26)中的给定氨基酸位置将通过与当编号涵盖如在Uniprot数据库中的整个IgG1重链恒定结构域(由C<sub>H</sub>1、铰链、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3区组成)时的相同位置不同的编号来鉴定。例如,人G1Fc序列(SEQ ID NO:22)、人IgG1重链恒定结构域(Uniprot P01857)和人IgG1重链中选择的C<sub>H</sub>3位置之间的对应关系如下。

[0215]

在不同编号系统中C <sub>H</sub> 3位置的对应关系		
G1Fc (编号在铰链区中的 第一个苏氨酸处开始)	IgG1重链 恒定结构域 (编号在C <sub>H</sub> 1处开始)	IgG1重链 (Kabat等人, 1991* 的EU编号方案)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368

[0216]

K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409

\* Kabat等人 (编辑) 1991; 第688-696页在*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 第1卷, NIH, Bethesda, MD。

[0217] 在某些方面中,本文所公开的多肽可以形成蛋白质复合物,其包含与至少一种ActRIIB多肽共价或非共价缔合的至少一种ALK4多肽。优选地,本文所公开的多肽形成异二聚体复合物,但是还包括更高阶的异多聚复合物(异多聚体),例如但不限于异三聚体、异四聚体和其他寡聚体结构(参见例如,图21-23)。在一些实施方案中,ALK4和/或ActRIIB多肽包含至少一个多聚化结构域。如本文所公开的,术语“多聚化结构域”是指促进至少第一多肽与至少第二多肽之间的共价或非共价相互作用的氨基酸或氨基酸序列。本文所公开的多肽可以与多聚化结构域共价或非共价连接。优选地,多聚化结构域促进第一多肽(例如,ALK4多肽)与第二多肽(例如,ActRIIB多肽)之间的相互作用以促进异多聚体形成(例如,异二聚体形成),并且任选地阻碍或以其他方式不利于同多聚体形成(例如,同二聚体形成),由此提高所需异多聚体的产量(参见例如,图22)。

[0218] 本领域已知的许多方法可以用于产生ALK4:ActRIIB异多聚体。例如,可以通过如下方式来构建非天然存在的二硫键:用含有游离巯醇的残基(如半胱氨酸)置换第一多肽(例如,ALK4多肽)上天然存在的氨基酸,使得游离巯醇与第二多肽(例如,ActRIIB多肽)上的另一个含有游离巯醇的残基相互作用,使得在第一与第二多肽之间形成二硫键。促进异多聚体形成的相互作用的其他例子包括但不限于离子相互作用,如Kjaergaard等人, WO2007147901所述;静电转向效应,如Kannan等人, U.S. 8,592,562所述;卷曲螺旋相互作用,如Christensen等人, U.S. 20120302737所述;亮氨酸拉链,如Pack和Plueckthun, (1992) Biochemistry 31:1579-1584所述;以及螺旋-转角-螺旋基序,如Pack等人, (1993) Bio/Technology 11:1271-1277所述。各个区段的连接可以经由例如共价结合(如通过化学交联、肽接头、二硫桥等)或亲和相互作用(如通过亲和素-生物素或亮氨酸拉链技术)获得。

[0219] 在某些方面中,多聚化结构域可以包含相互作用对的一个组分。在一些实施方案中,本文所公开的多肽可以形成包含与第二多肽共价或非共价缔合的第一多肽的蛋白质复合物,其中第一多肽包含ALK4多肽的氨基酸序列和相互作用对的第一成员的氨基酸序列;并且第二多肽包含ActRIIB多肽的氨基酸序列和相互作用对的第二成员的氨基酸序列。相互作用对可以是相互作用以形成复合物(特别是异二聚体复合物)的任何两个多肽序列,但是可操作的实施方案也可以使用可以形成同二聚体复合物的相互作用对。相互作用对的一个成员可以与如本文所述的ALK4或ActRIIB多肽融合,所述ALK4或ActRIIB多肽包括例如如下多肽序列,所述多肽序列包含与SEQ ID N0:2、3、5、6、15和19中的任一个的序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基

酸序列组成。可以选择相互作用对以赋予改善的特性/活性(如增加的血清半衰期)或充当衔接子,在所述衔接子上附接另一个部分以提供改善的特性/活性。例如,聚乙二醇部分可以附接至相互作用对的一个或两个组分,以提供改善的特性/活性如改善的血清半衰期。

[0220] 相互作用对的第一和第二成员可以是不对称对,意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自我缔合。因此,不对称相互作用对的第一和第二成员可以缔合以形成异二聚体复合物(参见例如,图22)。可替代地,相互作用对可以是非引导的,意味着所述对的成员可以彼此缔合或自我缔合而没有实质的优先性,并且因此可以具有相同或不同的氨基酸序列。因此,非引导相互作用对的第一和第二成员可以缔合以形成同二聚体复合物或异二聚体复合物。任选地,相互作用对(例如,不对称对或非引导相互作用对)的第一成员与相互作用对的第二成员共价缔合。任选地,相互作用对(例如,不对称对或非引导相互作用对)的第一成员与相互作用对的第二成员非共价缔合。

[0221] 作为具体例子,本公开文本提供了包含与如下多肽融合的ALK4或ActRIIB的融合蛋白,所述多肽包含免疫球蛋白的恒定结构域,如从人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4衍生的CH1、CH2或CH3结构域,所述恒定结构域已经进行修饰以促进异多聚体形成。在从单一细胞系大规模生产不对称的基于免疫球蛋白的蛋白质中出现的问题被称为“链缔合问题”。正如在双特异性抗体的生产中主要面临的问题,链缔合问题涉及从多种组合中有效产生所需多链蛋白的挑战,所述多种组合是在单一细胞系中产生不同的重链和/或轻链时固有地产生[Klein等人(2012)mAbs 4:653-663]。这个问题当在同一细胞中产生两种不同的重链和两种不同的轻链时最为严重,在这种情况下,当通常只需要一种组合时,存在总共16种可能的链组合(但是其中一些组合是相同的)。然而,相同的原理解释了仅并入两条不同(不对称)重链的所需多链融合蛋白的产量降低。

[0222] 本领域已知在单一细胞系中增加所需的含Fc融合多肽链的配对以在可接受的产量下产生优选的不对称融合蛋白的多种方法[Klein等人(2012)mAbs 4:653-663;和Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67 (2A):95-106]。获得所需的含Fc链的配对的方法包括但不限于基于电荷的配对(静电转向)、“杵臼结构(knobs-into-holes)”空间配对、SEED体配对和基于亮氨酸拉链的配对[Ridgway等人(1996)Protein Eng 9:617-621;Merchant等人(1998)Nat Biotech 16:677-681;Davis等人(2010)Protein Eng Des Sel 23:195-202;Gunasekaran等人(2010);285:19637-19646;Wranik等人(2012)JBiol Chem 287:43331-43339;US 5932448;WO 1993/011162;WO 2009/089004和WO 2011/034605]。如本文所述,这些方法可以用于产生ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异多聚体复合物。参见例如,图23。

[0223] 先前已经披露了ALK4:ActRIIB异多聚体和制备此类异多聚体的方法。参见例如,WO 2016/164497,将其全部教导通过引用并入本文。

[0224] 应理解,融合蛋白(例如,免疫球蛋白Fc融合蛋白)的不同元件能以符合所需功能性的任何方式排列。例如,ActRII多肽结构域、ALK4多肽结构域或TGF $\beta$ RII多肽结构域可以位于异源结构域的C末端,或者可替代地,异源结构域可以位于ActRII多肽结构域、ALK4多肽结构域或TGF $\beta$ RII多肽结构域的C末端。ActRII多肽结构域、ALK4多肽结构域或TGF $\beta$ RII多肽结构域与异源结构域在融合蛋白中无需相邻,并且可以在任一结构域的C末端或N末端或者在结构域之间包括其他结构域或氨基酸序列。

[0225] 例如,ActRII(或ALK4或TGF $\beta$ RII)受体融合蛋白可以包含如式A-B-C中所述的氨基

酸序列。B部分对应于ActRII(或ALK4或TGF $\beta$ RII)多肽结构域。A部分和C部分可以独立地是零个、一个或超过一个氨基酸，并且A部分和C部分二者在存在的情况下对于B都是异源的。A部分和/或C部分可以通过接头序列附接至B部分。接头可以富含甘氨酸(例如，2-10、2-5、2-4、2-3个甘氨酸残基)或甘氨酸和脯氨酸残基，并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单个序列或苏氨酸/丝氨酸和/或甘氨酸的重复序列，例如GGG(SEQ ID NO:27)、GGGG(SEQ ID NO:28)、TGGGG(SEQ ID NO:29)、SGGGG(SEQ ID NO:30)、TGGG(SEQ ID NO:31)、SGGG(SEQ ID NO:32)或GGGGS(SEQ ID NO:33)单个序列或重复序列。在某些实施方案中，ActRII(或ALK4或TGF $\beta$ RII)融合蛋白包含如式A-B-C中所述的氨基酸序列，其中A是前导(信号)序列，B由ActRII(或ALK4或TGF $\beta$ RII)多肽结构域组成，并且C是增强以下中的一种或多种的多肽部分：体内稳定性、体内半衰期、摄取/给予、组织定位或分布、蛋白质复合物的形成和/或纯化。在某些实施方案中，ActRII(或ALK4或TGF $\beta$ RII)融合蛋白包含如式A-B-C中所述的氨基酸序列，其中A是TPA前导序列，B由ActRII(或ALK4或TGF $\beta$ RII)受体多肽结构域组成，并且C是免疫球蛋白Fc结构域。优选的融合蛋白包含以下中的任一个中所述的氨基酸序列：SEQ ID NO:50、54、57、58、60、63、64、66、70、71、73、74、76、77、78、79、80、123、131、132、139、141、143、145、148和150。

[0226] 可替代地，ActRII拮抗剂可以包含一个或多个单链配体阱，其任选地可以与一种或多种ALK4或ActRIIB多肽以及其他ALK4:ActRIIB单链配体阱共价或非共价缔合[US 2011/0236309和US 2009/0010879]。如本文所述，单链配体阱不需要与任何多聚化结构域(如卷曲螺旋Fc结构域)融合以成为多价的。通常，本公开文本的单链配体阱包含至少一个ALK4多肽结构域和一个ActRIIB多肽结构域。ALK4和ActRIIB多肽结构域在本文中通常被称为结合结构域(BD)，任选地可以通过接头区连接。先前已经描述了ALK4:ActRIIB单链配体阱。参见例如，WO 2016/164497，将其各自的全部教导通过引用并入本文。

[0227] 在某些优选实施方案中，要根据本文所述的方法使用的ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽和ALK4:ActRIIB异多聚体是分离的复合物。如本文所用，分离的蛋白质(或蛋白质复合物)或多肽(或多肽复合物)是已经与其天然环境的组分分离的蛋白质或多肽。在一些实施方案中，将本公开文本的多肽或异多聚体纯化至大于95%、96%、97%、98%或99%纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如，离子交换或反相HPLC)所测定的。用于评估抗体纯度的方法是本领域公知的[Flatman等人，(2007)J.Chromatogr.B 848:79-87]。

[0228] 在某些实施方案中，本公开文本的ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽和ALK4:ActRIIB异多聚体可以通过多种本领域已知的技术来产生。例如，本公开文本的多肽可以使用标准蛋白质化学技术来合成，如以下文献中所述的那些技术：Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, 柏林(1993) 和 Grant G.A. (编辑), Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company, 纽约(1992)。另外，自动化肽合成仪是可商购的(Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。可替代地，本公开文本的多肽和复合物(包括其片段或变体)可以使用如本领域公知的各种表达系统[大肠杆菌(E.coli)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、杆状病毒]重组产生。在另一实施方案中，本公开文本的经修饰或未经修饰的多肽可以通过使用例如蛋白酶(例如，胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶或成对碱性氨基酸转化酶(PACE))消化重组产生的全长

ALK4、TGF $\beta$ RII和/或ActRIIB多肽来产生。计算机分析(使用可商购的软件,例如MacVector、Omega、PCGene,Molecular Simulation, Inc.)可以用于鉴定蛋白质水解切割位点。

[0229] 3. 编码ActRII、ALK4和TGF $\beta$ RII多肽的核酸

[0230] 在某些实施方案中,本公开文本提供了编码本文所公开的ActRII、ALK4和/或TGF $\beta$ RII多肽(包括其片段、功能变体和融合蛋白)的分离的和/或重组的核酸。例如,SEQ ID NO:16编码天然存在的人ALK4前体多肽,SEQ ID NO:17编码ALK4的经加工的细胞外结构域。主题核酸可以是单链或双链的。此类核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可以用于例如制备如本文所述的ActRII多肽、ALK4多肽、TGF $\beta$ RII多肽和ALK4:ActRIIB异多聚体的方法中。

[0231] 如本文所用,一种或多种分离的核酸是指已经与其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括细胞中含有的核酸分子,所述细胞通常含有所述核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0232] 在某些实施方案中,编码本公开文本的ALK4、ActRII或TGF $\beta$ RII多肽的核酸应理解为包括以下中的任一个:SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、134、135、136、137、138、140、142、144、146和149以及其变体。变体核苷酸序列包括相差一个或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列,包括等位基因变体,并且因此将包括与以下中的任一个所指定的核苷酸序列不同的编码序列:SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、134、135、136、137、138、140、142、144、146和149。

[0233] 在某些实施方案中,本公开文本的ALK4、ActRII、TGF $\beta$ RII多肽由分离或重组的核酸序列编码,所述核酸序列包含与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、134、135、136、137、138、140、142、144、146和149至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成。本领域普通技术人员应理解,包含和与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、134、135、136、137、138、140、142、144、146和149至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列互补的序列、基本上由所述序列组成或由所述序列组成的核酸序列也在本公开文本的范围内。在进一步的实施方案中,本公开文本的核酸序列可以与异源核苷酸序列分离、重组和/或融合,或者在DNA文库中。

[0234] 在其他实施方案中,本公开文本的核酸还包括在严格条件下与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、134、135、136、137、138、140、142、144、146和149中所指定的核苷酸序列或其片段杂交的核苷酸序列。本领域普通技术人员应容易理解,促进DNA杂交的适当严格度条件可以变化。例如,可以在6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)下在约45°C下进行杂交,之后用2.0x SSC在50°C下洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可以选自在50°C下的约2.0x SSC的低严格度至在50°C下的约0.2x SSC的高严格度。另外,洗涤步骤中的温度可以从室温(约22°C)下的低严格度条件上升至约65°C下的高严格度条件。温度和盐二者都可以变化,或者温度或盐浓度可以保持恒定,同时改变另一个变量。在一个实施方案中,本公开文本提供了如下核酸,其在室温下在6x SSC的低严格度条件下杂交,之后在室温下在2x SSC下洗涤。

[0235] 在遗传密码的简并性方面与如SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、

72、75、124、125、126、127、134、135、136、137、138、140、142、144、146和149中所述的核酸不同的分离的核酸也在本公开文本的范围内。例如,许多氨基酸由超过一个三联体指定。指定相同氨基酸的密码子或同义词(例如,CAU和CAC是组氨酸的同义词)可以导致“沉默”突变,其不影响蛋白质的氨基酸序列。然而,预期在哺乳动物细胞中存在确实导致主题蛋白质的氨基酸序列变化的DNA序列多态性。本领域技术人员应理解,由于天然等位基因变异,编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸(高达约3%-5%的核苷酸)的这些变异可以存在于给定物种的个体中。任何和所有此类核苷酸变异和所得氨基酸多态性都在本公开文本的范围内。

[0236] 在某些实施方案中,本公开文本的重组核酸可以与表达构建体中的一个或多个调控核苷酸序列可操作地连接。调控核苷酸序列通常将适合于用于表达的宿主细胞。对于多种宿主细胞,本领域已知许多类型的适当表达载体和适合的调控序列。通常,所述一个或多个调控核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列以及增强子或激活子序列。本公开文本考虑了如本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或组合超过一种启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体如质粒上,或者表达构建体可以插入染色体中。在一些实施方案中,表达载体含有可选择的标记基因以允许选择经转化的宿主细胞。可选择的标记基因是本领域公知的,并且随着所用宿主细胞而变化。

[0237] 在本公开文本的某些方面中,主题核酸在包含编码ALK4、ActRII和/或TGF $\beta$ RII多肽的核苷酸序列的表达载体中提供,并且与至少一个调控序列可操作地连接。调控序列是本领域公认的,并且进行选择以指导ALK4、ActRII和/或TGF $\beta$ RII多肽的表达。因此,术语调控序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示例性调控序列描述于Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press,圣地亚哥,加利福尼亚州(1990)中。例如,众多的在与DNA序列操作性连接时控制所述DNA序列表达的表达控制序列中的任一种可以在这些载体中用于表达编码ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽的DNA序列。此类有用的表达控制序列包括例如SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、T7启动子(其表达由T7RNA聚合酶指导)、噬菌体 $\lambda$ 的主要操纵子和启动子区域、fd外壳蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如,Pho5)、酵母 $\alpha$ -交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子和已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其他序列及其各种组合。应理解,表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞和/或期望表达的蛋白质类型的选择等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由载体编码的任何其他蛋白质如抗生素标记物的表达。

[0238] 本公开文本的重组核酸可以通过将所克隆基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或二者中表达的载体中来产生。用于产生重组TGF $\beta$ 超家族I型和/或II型受体多肽的表达运载体包括质粒和其他载体。例如,适合的载体包括以下类型的质粒:用于在原核细胞(如大肠杆菌)中表达的pBR322衍生的质粒、pEMBL衍生的质粒、pEX衍生的质粒、pBTac衍生的质粒和pUC衍生的质粒。

[0239] 一些哺乳动物表达载体既含有原核序列以促进载体在细菌中的增殖,又含有一个

或多个在真核细胞中表达的真核转录单位。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体是适合于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的例子。将这些载体中的一些用来自细菌质粒(如pBR322)的序列修饰,以促进原核和真核细胞中的复制和药物抗性选择。可替代地,病毒如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)(pHEBo、pREP衍生的和p205)的衍生物可以用于在真核细胞中蛋白质的短暂表达。其他病毒(包括逆转录病毒)表达系统的例子可以在以下基因疗法递送系统的描述中找到。用于制备质粒和转化宿主生物的多种方法是本领域公知的。对于原核和真核细胞的其他合适的表达系统,以及一般的重组程序[Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3版,Sambrook,Fritsch和Maniatis编辑Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001]。在一些情况下,可能需要通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。此类杆状病毒表达系统的例子包括pVL衍生的载体(如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW衍生的载体(如pAcUW1)和pBlueBac衍生的载体(如含有 $\beta$ -gal的pBlueBac III)。

[0240] 在一个优选实施方案中,载体将被设计用于在CHO细胞中产生主题ALK4和/或ActRII多肽,如Pcmv-Script载体(Stratagene,拉荷亚,加利福尼亚州)、pcDNA4载体(Invitrogen,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)和pCI-neo载体(Promega,麦迪逊,威斯康辛州)。清楚的是,主题基因构建体可以用于引起主题ALK4和/或ActRII多肽在培养中所繁殖细胞中的表达,例如以产生蛋白质(包括融合蛋白或变体蛋白)以供纯化。

[0241] 本公开文本还涉及用重组基因转染的宿主细胞,所述重组基因包括主题ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽中的一种或多种的编码序列。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽可以在细菌细胞(如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞[例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系]中表达。其他适合的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0242] 因此,本公开文本进一步涉及产生主题ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽的方法。例如,可以在允许发生ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽的表达的适当条件下培养用编码ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽的表达载体转染的宿主细胞。多肽可以分泌并从细胞和含有多肽的培养基的混合物中分离。可替代地,ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽可以从得自所收获和裂解的细胞的细胞质或膜级分中分离。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的适合的培养基是本领域公知的。主题多肽可以使用本领域已知用于纯化蛋白质的技术从细胞培养基、宿主细胞或二者中分离,所述技术包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳、使用对ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽的特定表位具有特异性的抗体进行的免疫亲和纯化以及使用结合至与ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽融合的结构域的试剂进行的亲和纯化(例如,可以使用蛋白质A柱来纯化ALK4-Fc、ActRIIB-Fc和/或TGF $\beta$ RII-Fc融合蛋白)。在一些实施方案中,ALK4和/或ActRII多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0243] 在一些实施方案中,通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以任何顺序的以下步骤中的三步或更多步:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。可以将ALK4-Fc、ActRIIB-Fc和/或TGF $\beta$ RII-Fc融合蛋白以及其异聚复合物纯化至>90%、>95%、>96%、>98%或>99%的纯

度,如通过尺寸排阻色谱所测定的;以及纯化至>90%、>95%、>96%、>98%或>99%的纯度,如通过SDS PAGE所测定的。目标纯度水平应是足以在哺乳动物系统(特别是在非人灵长类动物、啮齿类动物(小鼠)和人)中获得期望的结果的纯度水平。

[0244] 在另一个实施方案中,编码纯化前导序列(如在重组ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽的所需部分N末端的聚(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可以允许通过亲和色谱使用Ni<sup>2+</sup>金属树脂纯化所表达的融合蛋白。然后随后可以通过用肠激酶处理去除纯化前导序列,以提供经纯化的ALK4、ActRIIB和/或TGF $\beta$ RII多肽以及其异聚复合物[Hochuli等人(1987)J.Chromatography 411:177;和Janknecht等人(1991)PNAS USA 88:8972]。

[0245] 制备融合基因的技术是公知的。实质上,编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接按照常规技术进行,采用平端或错端末端进行连接,进行限制酶消化以提供适当的末端,适当地填充粘性末端,进行碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接以及进行酶促连接。在另一个实施方案中,融合基因可以通过包括自动化DNA合成仪的常规技术合成。可替代地,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补突出端,所述片段随后可以退火以产生嵌合基因序列。参见例如,Current Protocols in Molecular Biology,编辑Ausubel等人,John Wiley&Sons:1992。

[0246] 4.抗体拮抗剂

[0247] 在某些方面中,本公开文本涉及ActRII拮抗剂(抑制剂),其是抗体或抗体组合。ActRII拮抗剂抗体或抗体组合可以结合至一种或多种ActRII配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]或一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)。具体地,本公开文本提供了单独地或与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合地使用ActRII拮抗剂抗体或ActRII拮抗剂抗体组合以在有需要的受试者体内实现所需效果(例如,提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)的方法。在某些优选实施方案中,ActRII拮抗剂抗体可以与TGF $\beta$ RII拮抗剂组合使用。

[0248] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制GDF11的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少GDF11。如本文所用,GDF11抗体(抗GDF11抗体)通常是指以足够的亲和力结合至GDF11的抗体,使得所述抗体在靶向GDF11中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗GDF11抗体与无关的非GDF11蛋白结合的程度小于所述抗体与GDF11结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗GDF11抗体结合至GDF11的在来自不同物种的GDF11之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗GDF11抗体结合至人GDF11。在其他优选实施方案中,抗GDF11抗体可以抑制GDF11与同源I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制GDF11介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,GDF11与GDF8具有高序列同源性,并且因此在一些情况下,结合至GDF11的抗体也可以结合至和/或抑制GDF8。在一些实施方案中,抗GDF11抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例

如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗GDF11抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。

[0249] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制GDF8的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少GDF8。如本文所用, GDF8抗体(抗GDF8抗体)通常是指以足够的亲和力结合至GDF8的抗体,使得所述抗体在靶向GDF8中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗GDF8抗体与无关的非GDF8蛋白结合的程度小于所述抗体与GDF8结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗GDF8抗体结合至GDF8的在来自不同物种的GDF8之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗GDF8抗体结合至人GDF8。在其他优选实施方案中,抗GDF8抗体可以抑制GDF8与同源I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制GDF8介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,GDF8与GDF11具有高序列同源性,并且因此在一些情况下,结合至GDF8的抗体也可以结合至和/或抑制GDF11。在一些实施方案中,抗GDF8抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF11、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗GDF8抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF11、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。

[0250] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少激活素。如本文所用,激活素抗体(抗激活素抗体)通常是指以足够的亲和力结合至激活素的抗体,使得所述抗体在靶向激活素中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗激活素抗体与无关的非激活素蛋白结合的程度小于所述抗体与激活素结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗激活素抗体结合至激活素的在来自不同物种的激活素之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗激活素抗体结合至人激活素。在其他优选实施方案中,抗激活素抗体可以抑制激活素与同源I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制激活素介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,激活素共享序列同源性,并且因此结合至一种激活素(例如,激活素A)的抗体可以结合至一种或多种其他激活素(例如,激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E、激活素AC)。在一些实施方案中,抗激活素抗体结合至至少激活素A和激活素B。

在一些实施方案中,抗激活素抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗激活素抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF8、GDF11、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,要根据本公开文本的方法和用途使用的抗体或抗体组合结合至激活素和TGF $\beta$ 。在一些实施方案中,要根据本公开文本的方法和用途使用的抗体或抗体组合结合至激活素A和TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中,要根据本公开文本的方法和用途使用的抗体或抗体组合结合至ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和TGF $\beta$ 。在一些实施方案中,要根据本公开文本的方法和用途使用的抗体或抗体组合结合至ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和TGF $\beta$ 2。

[0251] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制GDF3的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少GDF3。如本文所用, GDF3抗体(抗GDF3抗体)通常是指以足够的亲和力结合至GDF3的抗体,使得所述抗体在靶向GDF3中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗GDF3抗体与无关的非GDF3蛋白结合的程度小于所述抗体与GDF3结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗GDF3抗体结合至GDF3的在来自不同物种的GDF3之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗GDF3抗体结合至人GDF3。在其他优选实施方案中,抗GDF3抗体可以抑制GDF3与同源I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制GDF3介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,抗GDF3抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗GDF3抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。

[0252] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制BMP6的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少BMP6。如本文所用, BMP6抗体(抗BMP6抗体)通常是指以足够的亲和力结合至BMP6的抗体,使得所述抗体在靶向BMP6中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗BMP6抗体与无关的非BMP6蛋白结合的程度小于所述抗体与BMP6结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗BMP6抗体结合至BMP6的在来自不同物种的BMP6之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗BMP6抗体结合至人BMP6。在其他优选实施

方案中,抗BMP6抗体可以抑制BMP6与同源I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制BMP6介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,抗BMP6抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗BMP6抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。

[0253] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制BMP9的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少BMP9。如本文所用,BMP9抗体(抗BMP9抗体)通常是指以足够的亲和力结合至BMP9的抗体,使得所述抗体在靶向BMP9中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗BMP9抗体与无关的非BMP9蛋白结合的程度小于所述抗体与BMP9结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗BMP9抗体结合至BMP9的在来自不同物种的BMP9之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗BMP9抗体结合至人BMP9。在其他优选实施方案中,抗BMP9抗体可以抑制BMP9与同源I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制BMP9介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,抗BMP9抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP10、BMP6、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗BMP9抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP10、BMP6、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。

[0254] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制BMP10的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少BMP10。如本文所用,BMP10抗体(抗BMP10抗体)通常是指以足够的亲和力结合至BMP10的抗体,使得所述抗体在靶向BMP10中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗BMP10抗体与无关的非BMP10蛋白结合的程度小于所述抗体与BMP10结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗BMP10抗体结合至BMP10的在来自不同物种的BMP10之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗BMP10抗体结合至人BMP10。在其他优选实施方案中,抗BMP10抗体可以抑制BMP10与同源I型和/或II型受体(例

如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)结合,并且因此抑制BMP10介导的通过这些受体进行的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,抗BMP10抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种其他配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗BMP10抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如不同配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]和/或结合至一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK5和ALK4)。

[0255] 在其他方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制ActRII受体(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ActRIIA,但是不结合或基本上不结合至ActRIIB(例如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的K<sub>D</sub>结合至ActRIIB,或者具有相对较低的结合,例如约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在其他实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ActRIIB,但是不结合或基本上不结合至ActRIIA(例如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的K<sub>D</sub>结合至ActRIIA,或者具有相对较低的结合,例如约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在仍其他实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ActRIIA和ActRIIB。如本文所用,ActRII抗体(抗ActRII抗体)通常是指以足够的亲和力结合至ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的抗体,使得所述抗体在靶向ActRII中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗ActRII抗体与无关的非ActRII蛋白结合的程度小于所述抗体与ActRII结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗ActRII抗体结合至ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的在来自不同物种的ActRII之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗ActRII抗体结合至人ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)。在其他优选实施方案中,抗ActRII抗体可以抑制一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]与ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)结合。应注意,ActRIIA与ActRIIB具有序列同源性,并且因此在一些情况下,结合至ActRIIA的抗体也可以结合至和/或抑制ActRIIB,反之亦然。在一些实施方案中,抗ActRII抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)和一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]。在一些实施方案中,抗ActRII抗体是结合至ActRIIA和ActRIIB的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含至少抗ActRIIA抗体和至少ActRIIB抗体。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗ActRIIA抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ALK4和/或ALK5。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗

ActRIIB抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ALK4和/或ALK5。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途(例如,提高有需要的患者的免疫应答和治疗癌症),其中所述抗体组合包含抗ActRIIA抗体、抗ActRIIB抗体和至少一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ALK4和/或ALK5。

[0256] 在某些方面中,本公开文本的ActRII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制ALK4的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ALK4。如本文所用,ALK4抗体(抗ALK4抗体)通常是指以足够的亲和力结合至ALK4的抗体,使得所述抗体在靶向ALK4中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗ALK4抗体与无关的非ALK4蛋白结合的程度小于所述抗体与ALK4结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗ALK4抗体结合至ALK4的在来自不同物种的ALK4之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗ALK4抗体结合至人ALK4。在其他优选实施方案中,抗ALK4抗体可以抑制一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]与ALK4结合。在一些实施方案中,抗ALK4抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至ALK4和一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或ALK5。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗ALK4抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或ALK5。

[0257] 在某些方面中,要根据本文所公开的方法和用途使用的TGF $\beta$ RII拮抗剂是TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合。TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合可以抑制和/或结合至例如一种或多种TGF $\beta$ RII配体(例如,TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3)、TGF $\beta$ RII受体、TGF $\beta$ RII相关I型受体(例如,ALK5)和/或TGF $\beta$ RII共受体(例如, $\beta$ 聚糖)。在一些实施方案中,在体外或基于细胞的测定(包括例如本文所述的那些)中测定TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合抑制信号传导(例如,Smad信号传导)和/或结合至靶标的能力。如本文所述,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或拮抗剂抗体组合可以单独地或与一种或多种其他支持疗法或活性剂(例如,ActRII拮抗剂)组合用于治疗或预防如本文所述的障碍或病症。

[0258] 在某些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制TGF $\beta$ 1的抗体。因此,在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少TGF $\beta$ 1。如本文所用,TGF $\beta$ 1抗体(抗TGF $\beta$ 1抗体)通常是指以足够的亲和力结合至TGF $\beta$ 1的抗体,使得所述抗体在靶向TGF $\beta$ 1中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗TGF $\beta$ 1抗体与无关的非TGF $\beta$ 1蛋白结合的程度小于所述抗体与TGF $\beta$ 1结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或

小于1%，如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案中，抗TGF $\beta$ 1抗体结合至TGF $\beta$ 1的在来自不同物种的TGF $\beta$ 1之间保守的表位。在某些优选实施方案中，抗TGF $\beta$ 1抗体结合至人TGF $\beta$ 1。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 1抗体可以抑制TGF $\beta$ 1与I型、II型和/或共受体(例如，TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖)结合，并且因此抑制TGF $\beta$ 1信号传导(例如，Smad信号传导)。应注意，TGF $\beta$ 1与TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3共享一定的序列同源性。因此，在一些实施方案中，结合TGF $\beta$ 1的抗体也可以结合至TGF $\beta$ 2和/或TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，本公开文本涉及多特异性抗体(例如，双特异性抗体)及其用途，所述多特异性抗体结合至TGF $\beta$ 1并且进一步结合至例如一种或多种其他TGF $\beta$ RII配体(例如，TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3或TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3)、一种或多种I型和/或II型受体(例如，TGF $\beta$ RII和ALK5)和/或一种或多种共受体(例如， $\beta$ 聚糖)。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体组合及其用途，其中所述抗体组合包含TGF $\beta$ 1抗体和一种或多种其他抗体，所述其他抗体结合至例如一种或多种其他TGF $\beta$ RII配体(例如，TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3或TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3)、一种或多种I型和/或II型受体(例如，TGF $\beta$ RII和ALK5)和/或一种或多种共受体(例如， $\beta$ 聚糖)。在一些实施方案中，抗TGF $\beta$ 1抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，所述多特异性抗体结合至一种或多种ActRII配体[例如，GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体组合以及其用途，其中所述抗体组合包含抗TGF $\beta$ 1抗体和一种或多种其他抗体，所述其他抗体结合至例如一种或多种ActRIIB配体[例如，GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。

[0259] 在某些实施方案中，TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制TGF $\beta$ 2的抗体。因此，在一些实施方案中，TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少TGF $\beta$ 2。如本文所用，TGF $\beta$ 2抗体(抗TGF $\beta$ 2抗体)通常是指能够以足够的亲和力结合至TGF $\beta$ 2的抗体，使得所述抗体在靶向TGF $\beta$ 2中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗TGF $\beta$ 2抗体与无关的非TGF $\beta$ 2蛋白结合的程度小于所述抗体与TGF $\beta$ 2结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%，如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案中，抗TGF $\beta$ 2抗体结合至TGF $\beta$ 2的在来自不同物种的TGF $\beta$ 2之间保守的表位。在某些优选实施方案中，抗TGF $\beta$ 2抗体结合至人TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 2抗体可以抑制TGF $\beta$ 2与I型、II型和/或共受体(例如，TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖)结合，并且因此抑制TGF $\beta$ 2信号传导(例如，Smad信号传导)。应注意，TGF $\beta$ 2与TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3共享一定的序列同源性。因此，在一些实施方案中，结合TGF $\beta$ 2的抗体也可以结合至TGF $\beta$ 1和/或TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，本公开文本涉及多特异性抗体(例如，双特异性抗体)及其用途，所述多特异性抗体结合至TGF $\beta$ 2并且进一步结合至例如一种或多种其他TGF $\beta$ RII配体(例如，TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 3或TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3)、一种或多种I型和/或II型受体(例如，TGF $\beta$ RII和ALK5)和/或一种或多种共受体(例如， $\beta$ 聚糖)。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体组合及其用途，其中所述抗体组合包含TGF $\beta$ 2抗体和一种或多种其他抗体，所述其他抗体结合至例如一种或多种其他TGF $\beta$ RII配体(例如，TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 3或TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3)、一种或多种I型和/或II型受体(例如，TGF $\beta$ RII和ALK5)和/或一种或多种共受体(例如， $\beta$ 聚糖)。在一些实施方案中，抗TGF $\beta$ 2抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，所述多特异性抗体结合至一种或多种ActRII配体[例如，GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。

激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗TGF $\beta$ 2抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种ActRIIB配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。

[0260] 在某些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制TGF $\beta$ 3的抗体。因此,在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少TGF $\beta$ 3。如本文所用,TGF $\beta$ 3抗体(抗TGF $\beta$ 3抗体)通常是指能够以足够的亲和力结合至TGF $\beta$ 3的抗体,使得所述抗体在靶向TGF $\beta$ 3中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗TGF $\beta$ 3抗体与无关的非TGF $\beta$ 3蛋白结合的程度小于所述抗体与TGF $\beta$ 3结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗TGF $\beta$ 3抗体结合至TGF $\beta$ 3的在来自不同物种的TGF $\beta$ 3之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗TGF $\beta$ 3抗体结合至人TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 3抗体可以抑制TGF $\beta$ 3与I型、II型和/或共受体(例如,TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖)结合,并且因此抑制TGF $\beta$ 3信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,TGF $\beta$ 3与TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 1共享一定的序列同源性。因此,在一些实施方案中,结合TGF $\beta$ 3的抗体也可以结合至TGF $\beta$ 2和/或TGF $\beta$ 1。在一些实施方案中,本公开文本涉及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体结合至TGF $\beta$ 3并且进一步结合至例如一种或多种其他TGF $\beta$ RII配体(例如,TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 1或TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 1)、一种或多种I型和/或II型受体(例如,TGF $\beta$ RII和ALK5)和/或一种或多种共受体(例如, $\beta$ 聚糖)。在一些实施方案中,抗TGF $\beta$ 3抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至一种或多种ActRII配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含抗TGF $\beta$ 3抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种ActRIIB配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK4、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。

[0261] 在某些方面中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制TGF $\beta$ RII的抗体。因此,在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少TGF $\beta$ RII。如本文所用,TGF $\beta$ RII抗体(抗TGF $\beta$ RII抗体)通常是指以足够的亲和力结合至TGF $\beta$ RII的抗体,使得所述抗体在靶向TGF $\beta$ RII中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗TGF $\beta$ RII抗体与无关的非TGF $\beta$ RII蛋白结合的程度小于所述抗体与TGF $\beta$ RII结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗TGF $\beta$ RII抗体结合至TGF $\beta$ RII的在来自不同物种的TGF $\beta$ RII之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗TGF $\beta$ RII抗体结合至人TGF $\beta$ RII。在一些实施方案中,抗TGF $\beta$ RII抗体可以抑制一种或多种TGF $\beta$ RII配体[例如,TGF $\beta$ 1;TGF $\beta$ 2;TGF $\beta$ 3;TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3;TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2;TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3;或TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]与TGF $\beta$ RII结合。在一些实施方案中,抗TGF $\beta$ RII抗体是多特异性抗体(例如,双特

异性抗体),所述多特异性抗体结合至TGF $\beta$ RII和一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含抗TGF $\beta$ RII抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。

[0262] 在某些方面中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制ALK5的抗体。因此,在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ALK5。如本文所用,ALK5抗体(抗ALK5抗体)通常是指以足够的亲和力结合至ALK5的抗体,使得所述抗体在靶向ALK5中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗ALK5抗体与无关的非ALK5蛋白结合的程度小于所述抗体与ALK5结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗ALK5抗体结合至ALK5的在来自不同物种的ALK5之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗ALK5抗体结合至人ALK5。在一些实施方案中,抗ALK5抗体可以抑制一种或多种TGF $\beta$ RII配体[例如,TGF $\beta$ 1;TGF $\beta$ 2;TGF $\beta$ 3;TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3;TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3;或TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]与ALK5结合。在一些实施方案中,抗ALK5抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至ALK5和一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含抗ALK5抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种TGF $\beta$ RII配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或 $\beta$ 聚糖。

[0263] 在某些方面中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合是至少抑制 $\beta$ 聚糖的抗体。因此,在一些实施方案中,TGF $\beta$ RII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少 $\beta$ 聚糖。如本文所用, $\beta$ 聚糖抗体(抗 $\beta$ 聚糖抗体)通常是指以足够的亲和力结合至 $\beta$ 聚糖的抗体,使得所述抗体在靶向 $\beta$ 聚糖中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗 $\beta$ 聚糖抗体与无关的非 $\beta$ 聚糖蛋白结合的程度小于所述抗体与 $\beta$ 聚糖结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗 $\beta$ 聚糖抗体结合至 $\beta$ 聚糖的在来自不同物种的 $\beta$ 聚糖之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗 $\beta$ 聚糖抗体结合至人 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,抗 $\beta$ 聚糖抗体可以抑制一种或多种TGF $\beta$ RII配体[例如,TGF $\beta$ 1;TGF $\beta$ 2;TGF $\beta$ 3;TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3;TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2;TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3;或TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]与 $\beta$ 聚糖结合。在一些实施方案中,抗 $\beta$ 聚糖抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),所述多特异性抗体结合至 $\beta$ 聚糖和一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或ALK5。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所

述抗体组合包含抗 $\beta$ 聚糖抗体和一种或多种其他抗体,所述其他抗体结合至例如一种或多种TGF $\beta$ RII配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、TGF $\beta$ RII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或ALK5。

[0264] 术语抗体在本文中以最广泛的含义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要其展现出所需的抗原结合活性即可。抗体片段是指除了完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和从抗体片段形成的多特异性抗体。参见例如,Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134;Plückthun,在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,纽约),第269-315页(1994);WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894、5,587,458和5,869,046。本文所公开的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在某些实施方案中,本公开文本的抗体包含附接至所述抗体并且能够被检测到的标记(例如,标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。在优选实施方案中,本公开文本的抗体是分离的抗体。

[0265] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134(2003);和 Hollinger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448。三抗体和四抗体也描述于以下文献中:Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134。

[0266] 单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或一部分或者轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。参见例如,美国专利号6,248,516。

[0267] 抗体片段可以通过多种技术来制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。

[0268] 本文中的抗体可以属于任何类别。抗体的类别是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。抗体有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的若干个类别可以被进一步分为子类别(同种型),例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域被称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。

[0269] 通常,用于本文所公开方法中的抗体优选地以高结合亲和力特异性结合至其靶抗原。亲和力可以表示为K<sub>D</sub>值并且反映固有的结合亲和力(例如,具有最小化的亲合力效应)。通常,结合亲和力是在体外(在无细胞环境中或细胞相关环境中)测量。本领域已知的许多测定(包括本文所公开的那些)中的任一种可以用于获得结合亲和力测量值,包括例如表面等离子体共振(Biacore<sup>TM</sup>测定)、放射性标记的抗原结合测定(RIA)和ELISA。在一些实施方案中,本公开文本的抗体以至少1x 10<sup>-7</sup>或更强、1x 10<sup>-8</sup>或更强、1x 10<sup>-9</sup>或更强、1x 10<sup>-10</sup>或更强、1x 10<sup>-11</sup>或更强、1x 10<sup>-12</sup>或更强、1x 10<sup>-13</sup>或更强或1x 10<sup>-14</sup>或更强的K<sub>D</sub>结合至其靶抗原[例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖]。

[0270] 在某些实施方案中,K<sub>D</sub>是通过用所关注抗体的Fab形式及其靶抗原进行的RIA来测

量,如以下测定所述。Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过以下方式来测量:在一个滴定系列的未标记抗原的存在下用最低浓度的放射性标记的抗原(例如,<sup>125</sup>I标记的)平衡Fab,然后用抗Fab抗体包衣的板捕获所结合抗原[参见例如,Chen等人(1999)J.Mol.Biol.293:865-881]。为了建立用于测定的条件,用捕获抗Fab抗体(例如,来自Cappel Labs)包衣多孔板(例如,来自Thermo Scientific的MICROTITER<sup>®</sup>) (例如,过夜),并且之后用牛血清白蛋白优选地在室温(例如,大约23°C)下封闭。在非吸附板中,将放射性标记的抗原与所关注Fab的连续稀释液混合[例如,与对抗VEGF抗体Fab-12的评估一致,在Presta等人,(1997)Cancer Res.57:4593-4599]。然后将所关注Fab优选地孵育过夜,但是孵育可以持续较长时间段(例如,约65小时)以确保达到平衡。之后,将混合物转移至捕获板以供优选地在室温下孵育约1小时。然后去除溶液,并且优选地用聚山梨醇酯20和PBS混合物将板洗涤若干次。在板干燥后,添加闪烁体(例如,来自Packard的MICROSCINT<sup>®</sup>),并且在γ计数器(例如,来自Packard的TOPCOUNT<sup>®</sup>)上对板计数。

[0271] 根据另一个实施方案,K<sub>D</sub>是使用表面等离子体共振测定使用例如BIACORE<sup>®</sup>2000或BIACORE<sup>®</sup>3000(Biacore, Inc., 皮斯卡塔韦, 新泽西州)用固定化抗原CM5芯片以约10个反应单位(RU)来测量。简单来说,根据供应商的说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,Biacore, Inc.)。例如,可以用10mM乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释至5μg/ml(约0.2μM),之后以5μl/分钟的流速注射以达到大约10个反应单位(RU)的偶联蛋白。在抗原注射后,注射1M乙醇胺以封闭未反应基团。对于动力学测量,在含有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20<sup>®</sup>)表面活性剂的PBS(PBST)中以大约25μl/min的流速注射Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用例如简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE<sup>®</sup>评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(k<sub>on</sub>)和解离速率(k<sub>off</sub>)。将平衡解离常数(K<sub>D</sub>)计算为比率k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>[参见例如,Chen等人,(1999)J.Mol.Biol.293:865-881]。如果通过上述表面等离子体共振测定测得缔合速率超过例如10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>,则可以通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,所述荧光淬灭技术测量在PBS中在浓度递增的抗原存在下,20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(例如,激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或降低,如在具有搅拌比色皿的光谱仪如配备停流附件(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO<sup>®</sup>分光光度计(ThermoSpectronic)中所测量的。

[0272] 人ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、TGFβRII、ALK5和/或β聚糖的核酸和氨基酸序列是本领域公知的,并且因此用于根据本公开文本使用的抗体拮抗剂可以由技术人员基于本领域的知识和本文所提供的教导常规地制备。

[0273] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体是嵌合抗体。嵌合抗体是指如下抗体:其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同的来源或物种。某些嵌合抗体描述于例如以下文献中:美国专利号4,816,567;和Morrison等人,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855。在一些实施方案中,嵌合抗体包含

非人可变区(例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(如猴子)的可变区)和人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或子类别已经从亲代抗体的类别或子类别变化。通常,嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0274] 在某些实施方案中,本文所提供的嵌合抗体是人源化抗体。人源化抗体是指如下嵌合抗体,其包含来自非人超变区(HVR)的氨基酸残基和来自人框架区(FR)的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个(并且通常两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可以包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”是指已经经历人源化的抗体。

[0275] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619–1633中,并且进一步描述于例如以下文献中:Riechmann等人,(1988)Nature 332:323–329;Queen等人(1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA86:10029–10033;美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,(2005)Methods 36:25–34[描述SDR(a-CDR)移植];Padlan,Mol.Immunol.(1991)28:489–498(描述“表面重修”);Dall'Acqua等人(2005)Methods 36:43–60(描述“FR改组”);Osbourn等人(2005)Methods 36:61–68;和Klimka等人Br.J.Cancer(2000)83:252–260(描述用于FR改组的“导向选择”方法)。

[0276] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”法选择的框架区[参见例如,Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296];衍生自特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区[参见例如,Carter等人(1992)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,89:4285;和Presta等人(1993)J.Immunol.,151:2623];人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区[参见例如,Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619–1633];和衍生自筛选FR文库的框架区[参见例如,Baca等人,(1997)J.Biol.Chem.272:10678–10684;和Rosok等人,(1996)J.Biol.Chem.271:22611–22618]。

[0277] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的多种技术来产生。人抗体总体上描述于以下文献中:van Dijk和van de Winkel(2001)Curr.Opin.Pharmacol.5:368–74和Lonberg(2008)Curr.Opin.Immunol.20:450–459。

[0278] 人抗体可以通过将免疫原[例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖]给予转基因动物来制备,所述转基因动物已经进行修饰以响应抗原激发产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其置换内源免疫球蛋白基因座,或者其存在于染色体外或随机整合至动物染色体中。在此类转基因动物中,通常已经使内源免疫球蛋白基因座失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见例如Lonberg(2005)Nat.Biotechnol.23:1117–1125;美国专利号6,075,181和6,150,584(描述XENOMOUSE<sup>TM</sup>技术);美国专利号5,770,429(描述HuMab<sup>®</sup>技术);美国专利号7,041,870(描述K-M MOUSE<sup>®</sup>技术);和美国专利申请公开号2007/0061900(描述VelociMouse<sup>®</sup>技术)。来自由此类动物产生的完整抗体的人可变区可以例如通过与不同的人恒定区组合来进行进一

步修饰。

[0279] 本文所提供的抗体也可以通过基于杂交瘤的方法来制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系[参见例如,Kozbor J. Immunol.,(1984) 133:3001;Brodeur等人(1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页,Marcel Dekker, Inc., 纽约;和Boerner等人(1991) J. Immunol., 147:86]。通过人B细胞杂交瘤技术产生的抗体也描述于以下文献中:Li等人,(2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562。其他方法包括描述于例如以下文献中的那些:美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体);和Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26 (4) :265-268 (2006) (描述人-人杂交瘤)。人杂交瘤技术(三源杂交瘤技术)也描述于以下文献中:Vollmers和Brandlein (2005) Histol. Histopathol., 20 (3) :927-937 (2005) 以及Vollmers和Brandlein (2005) Methods Find Exp. Clin. Pharmacol., 27 (3) :185-91。

[0280] 本文所提供的抗体还可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生。然后可以将此类可变结构域序列与所需的人恒定结构域组合。用于从抗体文库中选择人抗体的技术描述于本文中。

[0281] 例如,本公开文本的抗体可以通过针对具有所需的一种或多种活性的抗体筛选组合文库来分离。本领域已知多种用于产生噬菌体展示文库和针对具有所需结合特征的抗体筛选此类文库的方法。此类方法综述于例如以下文献中:Hoogenboom等人(2001) 在Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien等人编辑, Human Press, 托托华, 新泽西州, 并且进一步描述于例如以下文献中:McCafferty等人(1991) Nature 348:552-554;Clackson等人,(1991) Nature 352:624-628;Marks等人(1992) J. Mol. Biol. 222:581-597;Marks和Bradbury (2003) 在Methods in Molecular Biology 248:161-175, Lo编辑, Human Press, 托托华, 新泽西州; Sidhu等人(2004) J. Mol. Biol. 338 (2) :299-310; Lee等人(2004) J. Mol. Biol. 340 (5) :1073-1093; Fellouse (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34) :12467-12472; 和Lee等人(2004) J. Immunol. Methods 284 (1-2) :119-132。

[0282] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆VH和VL基因库,并在噬菌体文库中随机重组,随后可以针对抗原结合噬菌体筛选所述噬菌体文库,如Winter等人(1994) Ann. Rev. Immunol., 12:433-455中所述。噬菌体通常展示作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段的抗体片段。来自经免疫来源的文库无需构建杂交瘤即可提供针对免疫原[例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖]的高亲和力抗体。可替代地,可以(例如,从人)克隆幼稚库以在不进行任何免疫的情况下提供针对广泛范围的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源,如Griffiths等人(1993) EMBO J, 12:725-734所述。最后,还可以通过以下方式合成地制备幼稚文库:从干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高可变CDR3区域并在体外完成重排,如Hoogenboom和Winter (1992) J. Mol. Biol., 227:381-388所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开案包括例如:美国专利号5,750,373以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0283] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体(通常是单克隆抗体)对一种或多种(例如,2、3、4、5、6种或更多种)抗原上的至少两个不同表位(例如,2、3、4、5或6个或更多个)具有结合特异性。

[0284] 本文中还包括具有三个或更多个功能抗原结合位点的工程化抗体(包括“章鱼抗体”)(参见例如,US 2006/0025576A1)。

[0285] 在某些实施方案中,本文所公开的抗体是单克隆抗体。单克隆抗体是指从基本上同质的抗体群获得的抗体,即构成所述群的单独抗体是相同的和/或结合相同表位,例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的产生期间出现的可能的变体抗体除外,此类变体通常以少量存在。与通常包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个表位。因此,修饰语“单克隆”指示抗体的特征为从基本上同质的抗体群获得,并且不应视为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,要根据本发明方法使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有人免疫球蛋白基因座的全部或部分的转基因动物的方法,此类方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法描述于本文中。

[0286] 例如,通过使用衍生自GDF11的免疫原,抗蛋白质/抗肽抗血清或单克隆抗体可以通过标准方案来制备[参见例如, *Antibodies:A Laboratory Manual* (1988) Harlow和Lane 编辑,Cold Spring Harbor Press]。可以用GDF11多肽的免疫原形式(其为能够诱发抗体反应的抗原性片段)或融合蛋白对哺乳动物(如小鼠、仓鼠或兔)进行免疫。用于向蛋白质或肽赋予免疫原性的技术包括缀合至载体或本领域公知的其他技术。GDF11多肽的免疫原性部分可以在佐剂存在下给予。可以通过检测血浆或血清中的抗体效价来监测免疫进程。能以免疫原作为抗原,使用标准ELISA或其他免疫测定评估抗体产生水平和/或结合亲和力水平。

[0287] 在用GDF11的抗原制剂对动物进行免疫后,可以获得抗血清,并且如果需要,可以从血清中分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,可以从经免疫动物收获产生抗体的细胞(淋巴细胞)并通过标准体细胞融合程序与永生细胞(如骨髓瘤细胞)融合,以产生杂交瘤细胞。此类技术是本领域公知的,并且包括例如杂交瘤技术[参见例如,Kohler和Milstein (1975) *Nature*,256:495-497]、人B细胞杂交瘤技术[参见例如,Kozbar等人(1983) *Immunology Today*,4:72]和用于产生人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术[Cole等人(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*,Alan R.Liss,Inc.第77-96页]。可以针对与GDF11多肽特异性反应的抗体的产生筛选杂交瘤细胞,并且可以从包含此类杂交瘤细胞的培养物中分离单克隆抗体。

[0288] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文所提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述人Fc区序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,取代、缺失和/或添加)。

[0289] 例如,本公开文本考虑了如下抗体变体,其具有一些而非全部效应子功能,这使得所述抗体变体成为多种应用的期望的候选者,在所述应用中抗体的体内半衰期是重要的,但是对于所述应用,某些效应子功能[例如,补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)]是不需要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或

ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc $\gamma$ RIII,而单核细胞表达Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII。造血细胞上的FcR表达概述于例如以下文献中:Ravetch和Kinet(1991)Annu.Rev.Immunol.9:457-492。用于评估所关注分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述于以下文献中:美国专利号5,500,362;Hellstrom,I.等人(1986)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA83:7059-7063;Hellstrom,I.等人(1985)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502;美国专利号5,821,337;和Bruggemann,M.等人(1987)J.Exp.Med.166:1351-1361。可替代地,可以采用非放射性测定方法(例如,ACTI<sup>TM</sup>,用于流式细胞术的非放射性细胞毒性测定;CellTechnology,Inc.,山景城,加利福尼亚州;和CytoTox 96<sup>®</sup>非放射性细胞毒性测定,Promega,麦迪逊,威斯康辛州)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可替代地,或另外地,所关注分子的ADCC活性可以在体内、例如在动物模型中评估,所述动物模型是如Clynes等人(1998)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA95:652-656中所披露的动物模型。还可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,并且因此缺少CDC活性[参见例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA]。为了评估补体激活,可以进行CDC测定[参见例如,Gazzano-Santoro等人(1996)J.Immunol.Methods 202:163;Cragg,M.S.等人(2003)Blood101:1045-1052;以及Cragg,M.S和M.J.Glennie(2004)Blood 103:2738-2743]。还可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除率/半衰期测定[参见例如,Petkova,S.B.等人(2006)Int.Immunol.18(12):1759-1769]。

[0290] 本公开文本的具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297的至丙氨酸的取代的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0291] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化的抗体,例如“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中,被取代的残基存在于抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,由此将反应性硫醇基定位于抗体的可及位点处,并且可以用于将抗体缀合至其他部分,如药物部分或接头-药物部分,以产生免疫缀合物,如本文中进一步所述。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸取代以下残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程化的抗体可以如例如以下文献中所述来产生:美国专利号7,521,541。

[0292] 另外,用于筛选抗体以鉴定期望的抗体的技术可能影响所获得抗体的特性。例如,如果要将抗体用于结合溶液中的抗原,可能需要测试溶液结合。多种不同的技术可用于测试抗体与抗原之间的相互作用,以鉴定特别期望的抗体。此类技术包括ELISA、表面等离子体共振结合测定(例如,Biacore<sup>TM</sup>结合测定,Biacore AB,乌普萨拉,瑞典)、夹心式测定(例如,顺磁性珠粒系统,IGEN International,Inc.,盖瑟斯堡,马里兰州)、蛋白质印迹、免疫沉淀测定和免疫组织化学。

[0293] 在某些实施方案中,考虑了本文所提供的抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗体和/或结合多肽的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体和/或结

合多肽的氨基酸序列变体可以通过将适当修饰引入编码抗体和/或结合多肽的核苷酸序列中或者通过肽合成来制备。此类修饰包括例如从抗体和/或结合多肽的氨基酸序列缺失、和/或插入所述氨基酸序列中、和/或取代所述氨基酸序列内的残基。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以取得最终构建体，前提是最终构建体具有所需特征，例如靶标结合(ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖结合)。

[0294] 可以在HVR中进行改变(例如，取代)，以例如改善抗体亲和力。此类改变可以在HVR“热点”(即在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基)(参见例如，Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179–196 (2008))和/或SDR(a-CDR)中进行，并且测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并从所述二级文库中重新选择进行的亲和力成熟已经描述于本领域中[参见例如，Hoogenboom等人，在*Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien等人编辑, Human Press, 托托华, 新泽西州, (2001)]。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法中的任何一种(例如，易错PCR、链改组或寡核苷酸指导的诱变)，将多样性引入选择进行成熟的可变基因中。然后建立二级文库。然后筛选文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR指导的方法，其中随机化若干个HVR残基(例如，一次4-6个残基)。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定抗原结合中所涉及的HVR残基。特别地，通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0295] 在某些实施方案中，取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR中，只要此类改变不显著降低抗体结合至抗原的能力即可。例如，不显著降低结合亲和力的保守改变(例如，如本文所提供的保守取代)可以在HVR中进行。此类改变可以位于HVR“热点”或SDR的外部。在上文所提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中，每个HVR或者不发生改变，或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0296] 鉴定抗体和/或结合多肽中可以被靶向用于诱变的残基或区域的有用方法被称为“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在这种方法中，鉴定残基或靶残基组(例如，带电荷的残基，如arg、asp、his、lys和glu)，并用中性或带负电荷的氨基酸(例如，丙氨酸或聚丙氨酸)置换以确定抗体或结合多肽与抗原的相互作用是否受影响。可以在所述氨基酸位置处引入进一步的取代，证明对初始取代的功能敏感性。可替代地，或另外地，抗原-抗体复合物的晶体结构可以用于鉴定抗体与抗原之间的接触点。可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基作为取代候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有所需特性。

[0297] 氨基酸序列插入物包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽范围内的氨基末端和/或羧基末端融合物，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入物的例子包括具有N末端甲硫氨酸残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如，对于ADEPT)或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0298] 在某些实施方案中，本文所提供的抗体和/或结合多肽可以进一步进行修饰以含有本领域已知并且容易获得的其他非蛋白质性部分。适于衍生化抗体和/或结合多肽的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚1，

3-二氧戊环、聚1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇(propylene glycol)均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而可以在制备中具有优势。所述聚合物可以具有任何分子量,并且可以有支链或无支链。附接至抗体和/或结合多肽的聚合物的数目可以变化,并且如果附接超过一种聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于包括但不限于以下的考虑因素来确定:要改善的抗体和/或结合多肽的特定特性或功能、抗体衍生物和/或结合多肽衍生物是否将要用于在确定条件下的治疗中。

[0299] 5. 小分子拮抗剂

[0300] 在其他方面中,本公开文本涉及ActRII拮抗剂(抑制剂),其是小分子或小分子组合。ActRII拮抗剂小分子可以抑制一种或多种ActRII配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、一种或多种I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和ALK4)或者一种或多种ActRII下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或Smad 3)。具体地,本公开文本提供了单独地或与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂(例如,TGF $\beta$ 拮抗剂)组合地使用ActRII拮抗剂小分子或ActRII拮抗剂小分子组合以在有需要的受试者体内实现所需效果(例如,提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)的方法。

[0301] 在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合,其至少抑制GDF11。在一些实施方案中,抑制GDF11的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合,其至少抑制GDF8。在一些实施方案中,抑制GDF8的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合,其至少抑制激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB和激活素AE)。在一些实施方案中,抑制激活素的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合,其至少抑制GDF3。在一些实施方案中,抑制GDF3的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合,其至少抑制BMP6。在一些实施方案中,抑制BMP6的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合,其至少抑制

BMP10。在一些实施方案中，抑制BMP10的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制BMP9。在一些实施方案中，抑制BMP9的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制ActRIIA。在一些实施方案中，抑制ActRIIA的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制ActRIIB。在一些实施方案中，抑制ActRIIB的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制ALK4。在一些实施方案中，抑制ALK4的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。

[0302] 在其他方面中，本公开文本涉及TGF $\beta$ 拮抗剂(抑制剂)，其是小分子或小分子组合。TGF $\beta$ 拮抗剂小分子可以抑制一种或多种TGF $\beta$ 配体[例如，TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、一种或多种I型和/或II型受体(例如，TGF $\beta$ RII和ALK5)、一种或多种共受体(例如， $\beta$ 聚糖)和/或一种或多种TGF $\beta$ 下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或Smad 3)。具体地，本公开文本提供了单独地或与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂(例如，ActRII拮抗剂)组合地使用TGF $\beta$ 拮抗剂小分子或TGF $\beta$ 拮抗剂小分子组合以在有需要的受试者体内实现所需效果(例如，提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)的方法。

[0303] 在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制TGF $\beta$ 1。在一些实施方案中，抑制TGF $\beta$ 1的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中，抑制TGF $\beta$ 2的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合，其至少抑制TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中，抑制TGF $\beta$ 3的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活

素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中, TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合, 其至少抑制TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中, 抑制TGF $\beta$ 3的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如, GDF11、GDF8、激活素(例如, 激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中, TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合, 其至少抑制TGF $\beta$ RII。在一些实施方案中, 抑制TGF $\beta$ RII的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如, GDF11、GDF8、激活素(例如, 激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中, TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合, 其至少抑制ALK5。在一些实施方案中, 抑制ALK5的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如, GDF11、GDF8、激活素(例如, 激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中, TGF $\beta$ 拮抗剂是小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合, 其至少抑制 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中, 抑制 $\beta$ 聚糖的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如, GDF11、GDF8、激活素(例如, 激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5和/或TGF $\beta$ RII。

[0304] 小分子拮抗剂可以是直接或间接抑制剂。例如, 间接小分子拮抗剂或小分子拮抗剂组合可以抑制至少一种或多种配体[例如, GDF8、激活素(例如, 激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、一种或多种I型和/或II型受体(例如, ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK4和ALK5)、一种或多种共受体( $\beta$ 聚糖)或一种或多种ActRII下游信号传导组分(例如, Smad 2和/或Smad 3)的表达(例如, 转录、翻译、细胞分泌或其组合)。可替代地, 直接小分子ActRII拮抗剂或小分子拮抗剂组合可以直接结合至例如以下中的一种或多种:一种或多种配体[例如, GDF8、激活素(例如, 激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、一种或多种I型和/或II型受体(例如, ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、ALK4和ALK5)、一种或多种共受体( $\beta$ 聚糖)或一种或多种ActRII下游信号传导组分(例如, Smad 2和/或Smad 3)。可以根据本文所公开的方法使用一种或多种间接小分子拮抗剂与一种或多种直接小分子拮抗剂的组合。

[0305] 本公开文本的结合有机小分子拮抗剂可以使用已知方法来鉴定和化学合成(参见例如, PCT公开号W0 00/00823和W0 00/39585)。通常, 本公开文本的小分子拮抗剂的大小通常低于约2000道尔顿, 可替代地大小低于约1500、750、500、250或200道尔顿, 其中此类有机小分子能够优选地特异性结合至如本文所述的多肽。使用公知技术不经过度实验即可鉴定此类小分子拮抗剂。就此而言, 应注意, 针对能够结合至多肽靶标的分子筛选有机小分子文库的技术是本领域公知的(参见例如, 国际专利公开号W0 00/00823和W0 00/39585)。

[0306] 本公开文本的结合有机小分子可以是例如醛、酮、肟、腙、缩氨基脲、卡巴肼、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的肼、酰肼、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、脲、氨基甲酸酯、碳酸酯、缩酮、硫代缩酮、缩醛、硫代缩醛、芳基卤、芳基磺酸酯、烷基卤、烷基磺酸酯、芳

香族化合物、杂环化合物、苯胺、烯烃、炔烃、二醇、氨基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺酰胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、磺酰氯、重氮化合物和酰基氯。

[0307] 6. 核苷酸拮抗剂

[0308] 在其他方面中，本公开文本涉及ActRII拮抗剂(抑制剂)，其是多核苷酸或多核苷酸组合。ActRII拮抗剂多核苷酸可以抑制一种或多种ActRII配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10和BMP9]、一种或多种I型和/或II型受体(例如，ActRIIA、ActRIIB和ALK4)或者一种或多种ActRII下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或Smad 3)。具体地，本公开文本提供了单独地或与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂(例如，TGF $\beta$ RII拮抗剂)组合地使用ActRII拮抗剂多核苷酸或ActRII拮抗剂多核苷酸组合以在有需要的受试者体内实现所需效果(例如，提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)的方法。

[0309] 在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制GDF11。在一些实施方案中，抑制GDF11的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制GDF8。在一些实施方案中，抑制GDF8的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB和激活素AE)。在一些实施方案中，抑制激活素的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII多核苷酸是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制GDF3。在一些实施方案中，抑制GDF3的多核苷酸或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制BMP6。在一些实施方案中，抑制BMP6的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制BMP10。在一些实施方案中，抑制BMP10的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如，GDF11、GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中，ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合，其至少抑制BMP9。在一些实施方案中，抑制BMP9的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制

一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制ActRIIA。在一些实施方案中,抑制ActRIIA的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIB、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制ActRIIB。在一些实施方案中,抑制ActRIIB的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ALK4、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制ALK4。在一些实施方案中,抑制ALK4的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。

[0310] 在其他方面中,本公开文本涉及TGF $\beta$ 拮抗剂(抑制剂),其是多核苷酸或多核苷酸组合。TGF $\beta$ 拮抗剂多核苷酸可以抑制一种或多种TGF $\beta$ 配体[例如,TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、一种或多种I型和/或II型受体(例如,TGF $\beta$ RII和ALK5)、一种或多种共受体(例如, $\beta$ 聚糖)和/或一种或多种TGF $\beta$ 下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或Smad 3)。具体地,本公开文本提供了单独地或与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂(例如,ActRII拮抗剂)组合地使用TGF $\beta$ 拮抗剂多核苷酸或TGF $\beta$ 拮抗剂多核苷酸组合以在有需要的受试者体内实现所需效果(例如,提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)的方法。

[0311] 在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制TGF $\beta$ 1。在一些实施方案中,抑制TGF $\beta$ 1的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制TGF $\beta$ 2。在一些实施方案中,抑制TGF $\beta$ 2的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中,抑制TGF $\beta$ 3的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制TGF $\beta$ 3。在一些实施方案中,抑制TGF $\beta$ 3的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)]。

GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 2]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制TGF $\beta$ RII。在一些实施方案中,抑制TGF $\beta$ RII的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制ALK5。在一些实施方案中,抑制ALK5的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,TGF $\beta$ 拮抗剂是多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合,其至少抑制 $\beta$ 聚糖。在一些实施方案中,抑制 $\beta$ 聚糖的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂组合进一步抑制一种或多种配体[例如,GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3]、ActRIIA、ActRIIB、ALK5和/或TGF $\beta$ RII。

[0312] 本公开文本的多核苷酸拮抗剂可以是反义核酸、RNAi分子[例如,小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)]、适体和/或核酶。人ALK4、ALK5、ActRIIA、ActRIIB、TGF $\beta$ RII、 $\beta$ 聚糖、GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3和 $\beta$ 聚糖的核酸和氨基酸序列是本领域已知的,并且因此用于根据本公开文本的方法使用的多核苷酸拮抗剂可以由技术人员基于本领域的知识和本文所提供的教导常规地制备。

[0313] 例如,反义技术可以用于通过反义DNA或RNA或者通过三螺旋形成来控制基因表达。反义技术论述于例如以下文献中:Okano(1991)J.Neurochem.56:560;Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press,博卡拉顿,佛罗里达州(1988)。三螺旋形成论述于例如以下文献中:Cooney等人(1988)Science 241:456;和Dervan等人,(1991)Science 251:1300。所述方法是基于多核苷酸与互补DNA或RNA的结合。在一些实施方案中,反义核酸包含与所需基因的RNA转录物的至少一部分互补的单链RNA或DNA序列。然而,虽然绝对互补性是优选的,但是并不需要。

[0314] 本文中所提及的“与RNA的至少一部分互补的”序列意指与RNA具有足够互补性,从而能够与所述RNA杂交形成稳定双链体的序列;在本文所公开的基因的双链反义核酸的情况下,可以因此测试双链体DNA的单链,或者可以测定三链体形成。杂交的能力将取决于反义核酸的互补性程度和长度二者。通常,杂交核酸越大,其可以含有的与RNA的碱基错配越多,并且仍然形成稳定的双链体(或如所述情况可以是三链体)。本领域技术人员可以通过使用标准程序确定可耐受的错配程度,以确定所杂交复合物的解链温度。

[0315] 与信使的5'端(例如,直至并且包括AUG起始密码子的5'非翻译序列)互补的多核苷酸应最有效地抑制翻译。然而,已经显示与mRNA的3'非翻译序列互补的序列也有效抑制mRNA的翻译[参见例如,Wagner,R.,(1994)Nature 372:333-335]。因此,与本公开文本的基因的5'或3'非翻译非编码区互补的寡核苷酸可以在反义方法中用于抑制内源mRNA的翻译。与mRNA的5'非翻译区互补的多核苷酸应包括AUG起始密码子的补体。与mRNA编码区互补的反义多核苷酸是较不有效的翻译抑制剂,但是可以根据本公开文本的方法来使用。不论是

被设计为与本公开文本的mRNA的5'非翻译区、3'非翻译区还是编码区杂交,反义核酸的长度应是至少6个核苷酸,并且优选地是长度在6至约50个核苷酸范围内的寡核苷酸。在具体方面中,寡核苷酸是至少10个核苷酸、至少17个核苷酸、至少25个核苷酸或至少50个核苷酸。

[0316] 在一个实施方案中,本公开文本的反义核酸是通过从外源序列转录而在细胞内产生。例如,转录载体或其部分,从而产生本公开文本的基因的反义核酸(RNA)。这种载体将含有编码所需反义核酸的序列。这种载体可以保持游离型或变为染色体整合的,只要其可以被转录以产生所需的反义RNA即可。此类载体可以通过本领域的重组DNA技术方法标准来构建。载体可以是用于在脊椎动物细胞中复制和表达的质粒、病毒或本领域已知的其他载体。编码本公开文本的所需基因的序列或其片段的表达可以通过本领域已知作用于脊椎动物(优选地人)细胞中的任何启动子来进行。此类启动子可以是诱导型或组成型的。此类启动子包括但不限于SV40早期启动子区[参见例如,Benoist和Chambon(1981)Nature 29:304-310]、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中所含的启动子[参见例如,Yamamoto等人(1980)Cell 22:787-797]、疱疹胸苷启动子[参见例如,Wagner等人(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445]和金属硫蛋白基因的调控序列[参见例如,Brinster等人(1982)Nature 296:39-42]。

[0317] 在一些实施方案中,多核苷酸拮抗剂是靶向一个或多个基因的表达的干扰RNA或RNAi分子。RNAi是指干扰所靶向的mRNA的表达的RNA的表达。具体来说,RNAi通过经siRNA(小干扰RNA)与特定mRNA相互作用使所靶向基因沉默。然后靶向ds RNA复合物以供细胞降解。siRNA分子是长度为10至50个核苷酸的双链RNA双链体,其干扰足够互补(例如,与所述基因具有至少80%同一性)的靶基因的表达。在一些实施方案中,siRNA分子包含与靶基因的核苷酸序列至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核苷酸序列。

[0318] 其他RNAi分子包括短发夹RNA(shRNA);以及短干扰发夹和微小RNA(miRNA)。shRNA分子含有来自靶基因的通过环连接的有义和反义序列。将shRNA从核转运至胞质中,并且其与mRNA一起降解。Pol III或U6启动子可以用于表达RNA以供进行RNAi。Paddison等人[Genes&Dev.(2002)16:948-958,2002]已经使用折叠成发夹的小RNA分子作为实现RNAi的手段。因此,此类短发夹RNA(shRNA)分子也有利地用于本文所述的方法中。功能shRNA的茎和环的长度是变化的;在不影响沉默活性的情况下,茎长度可以在约25至约30nt范围内的任何位置,并且环大小可以介于4至约25nt范围内。虽然不希望受任何特定理论的束缚,但是相信,这些shRNA与DICERRNA酶的双链RNA(dsRNA)产物相似,并且在任何事件中,具有抑制特定基因表达的相同能力。shRNA可以从慢病毒载体表达。miRNA是长度为约10至70个核苷酸的单链RNA,其首先转录为特征为“茎-环”结构的前miRNA,并且随后在通过RISC进一步加工后被加工成熟miRNA。

[0319] 介导RNAi的分子(包括但不限于siRNA)可以在体外通过以下方式产生:通过化学合成(Hohjoh,FEBS Lett 521:195-199,2002)、dsRNA的水解(Yang等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947,2002)、通过使用T7RNA聚合酶的体外转录(Donzeet等人,Nucleic Acids Res 30:e46,2002;Yu等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052,2002)和通过使用诸如大肠杆菌RNA酶III等核酸酶水解双链RNA(Yang等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947,2002)。

[0320] 根据另一个方面,本公开文本提供了多核苷酸拮抗剂,包括但不限于诱饵DNA、双链DNA、单链DNA、复合DNA、包封DNA、病毒DNA、质粒DNA、裸RNA、包封RNA、病毒RNA、双链RNA、能够产生RNA干扰的分子或其组合。

[0321] 在一些实施方案中,本公开文本的多核苷酸拮抗剂是适体。适体是如下核酸分子(包括双链DNA和单链RNA分子),其结合至并形成特异性结合至靶分子的三级结构,所述靶分子是如ALK4、ALK5、ActRIIB、ActRIIA、TGF $\beta$ RII、 $\beta$ 聚糖、GDF11、GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC)、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、TGF $\beta$ RII和/或 $\beta$ 聚糖多肽。适体的产生和治疗用途是本领域中充分确立的。参见例如,美国专利号5,475,096。关于适体的其他信息可见于美国专利申请公开号20060148748。核酸适体是使用本领域已知的方法来选择,例如通过指数富集配体系统进化(SELEX)法来选择。SELEX是用于与靶分子具有高特异性结合的核酸分子的体外进化的方法,如例如以下文献中所述:美国专利号5,475,096、5,580,737、5,567,588、5,707,796、5,763,177、6,011,577和6,699,843。另一种鉴定适体的筛选方法描述于以下文献中:美国专利号5,270,163。SELEX法是基于核酸形成多种二维和三维结构的能力,以及在核苷酸单体内充当配体可获得的化学通用性(与实际上任何化学化合物(无论是单体还是聚合物,包括其他核酸分子和多肽)形成特异性结合对)。任何大小或组成的分子都可以用作靶标。SELEX方法涉及从候选寡核苷酸的混合物中选择以及使用相同的通用选择方案的结合、分隔和扩增的逐步迭代,以达到所需的结合亲和力和选择性。从核酸混合物(其可以包含随机化序列的区段)开始,SELEX方法包括以下步骤:在有利于结合的条件下使混合物与靶标接触;分隔未结合的核酸与那些已经特异性结合至靶分子的核酸;使核酸-靶标复合物解离;扩增从核酸-靶标复合物解离的核酸以产生富集配体的核酸混合物。将结合、分隔、解离和扩增的步骤根据需要重复多个循环,以产生针对靶分子的高特异性、高亲和力核酸配体。

[0322] 通常,将此类结合分子单独给予动物[参见例如,O'Connor(1991)J.Neurochem.56:560],但是此类结合分子还可以在体内从宿主细胞吸收的多核苷酸表达以及在体内表达[参见例如,Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press,博卡拉顿,佛罗里达州(1988)]。

### [0323] 7. 卵泡抑素和FLRG拮抗剂

[0324] 在其他方面中,用于根据本文所公开的方法使用的ActRII拮抗剂(抑制剂)是卵泡抑素或FLRG多肽,其可以单独地或与如本文所公开的一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合地用于实现所需效果(例如,提高有需要的受试者的免疫应答和治疗癌症或病原体)。

[0325] 术语“卵泡抑素多肽”包括包含卵泡抑素的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽,并且所述术语进一步包括卵泡抑素的任何功能单体或多聚体。在某些优选实施方案中,本公开文本的卵泡抑素多肽结合至激活素和/或抑制激活素活性,特别是激活素A。卵泡抑素多肽的保留激活素结合特性的变体可以基于涉及卵泡抑素和激活素相互作用的先前研究来鉴定。例如,W02008/030367披露了显示对于激活素结合重要的特定的卵泡抑素结构域(“FSD”)。如下文在SEQ ID NO:46-48中所示,卵泡抑素N末端结构域(“FSND”SEQ ID NO:46)、FSD2(SEQ ID NO:48)和至较低程度的FSD1(SEQ ID NO:47)代表卵泡抑素内对于激活素结合重要的示例性结构

域。另外,制备和测试多肽文库的方法在上文中描述于ActRII多肽的背景下,并且此类方法也关于制备和测试卵泡抑素的变体。卵泡抑素多肽包括衍生自任何已知卵泡抑素的序列的多肽,所述多肽具有与卵泡抑素多肽的序列至少约80%相同,并且任选地具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的序列。卵泡抑素多肽的例子包括人卵泡抑素前体多肽(SEQ ID NO:44)的成熟卵泡抑素多肽或较短亚型或其他变体,如例如 WO2005/025601中所述。

[0326] 人卵泡抑素前体多肽亚型FST344如下:

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL

[0327] 51 SKEECCSTGR LSTSWEEDV NDNTLFKWMF FNNGAPNCIP CKETCENVDC  
101 GPGKKCRMNK KNKPRCVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC  
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRICPEPA

[0328] 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC  
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA  
301 ACSSGVILLE KHSGSCNSIS EDTEEEEDE DQDYSFPISS ILEW

[0329] (SEQ ID NO:44;NCBI参考号NP\_037541.1)

[0330] 信号肽加下划线;上文中最后27个残基也加下划线,所述残基代表C末端延伸,其将这种卵泡抑素亚型与下文所示的较短卵泡抑素亚型FST317相区分。

[0331] 人卵泡抑素前体多肽亚型FST317如下:

[0332]

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL  
51 SKEECCSTGR LSTSWEEDV NDNTLFKWMF FNNGAPNCIP CKETCENVDC  
101 GPGKKCRMNK KNKPRCVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC  
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRICPEPA  
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC  
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA  
301 ACSSGVILLE KHSGSCN ( SEQ ID NO: 45; NCBI参考号NP\_006341.1 )

[0333] 信号肽加下划线。

[0334] 卵泡抑素N末端结构域(FSND)序列如下:

[0335] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNNDNTLFKWMIFNNGAPNCIPCK (SEQ ID NO:46;FSND)

[0336] FSD1和FSD2序列如下:

[0337] ETCENVDCPGKKCRMNNKPRCV (SEQ ID NO:47;FSD1)

[0338] KTCRDVFPGSSTCVVDQTNNAYCVT (SEQ ID NO:48;FSD2)

[0339] 在其他方面中,用于根据本文所公开的方法使用的ActRII拮抗剂是卵泡抑素样相关基因(FLRG),还被称为卵泡抑素相关蛋白3(FSTL3)。术语“FLRG多肽”包括包含FLRG的任

何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽。在某些优选实施方案中,本公开文本的FLRG多肽结合至激活素和/或抑制激活素活性,特别是激活素A。FLRG多肽的保留激活素结合特性的变体可以使用测定FLRG和激活素相互作用的常规方法来鉴定(参见例如,US 6,537,966)。另外,制备和测试多肽文库的方法在上文中描述于ActRII多肽的背景下,并且此类方法也关于制备和测试FLRG的变体。FLRG多肽包括衍生自任何已知FLRG的序列的多肽,所述多肽具有与FLRG多肽的序列至少约80%相同,并且任选地具有至少85%、90%、95%、97%、99%或更高的同一性的序列。

[0340] 人FLRG前体(卵泡抑素相关蛋白3前体)多肽如下:

[0341]

1 MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMGSG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL  
51 VLQTDVTRAECASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD  
101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECCELRA  
151 ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC  
201 PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP  
251 PGGESAE~~EEE~~EE NFV ( SEQ ID NO: 49; NCBI参考号NP\_005851.1 )

[0342] 信号肽加下划线。

[0343] 在某些实施方案中,卵泡抑素多肽和FLRG多肽的功能变体或经修饰形式包括如下融合蛋白,其具有卵泡抑素多肽或FLRG多肽的至少一部分和一个或多个融合结构域,所述融合结构域是如例如促进多肽的分离、检测、稳定或多聚化的结构域。合适的融合结构域在上文中关于ActRII多肽进行详细论述。在一些实施方案中,本公开文本的拮抗剂药剂是如下融合蛋白,其包含融合至Fc结构域的卵泡抑素多肽的激活素结合部分。在另一个实施方案中,本公开文本的拮抗剂药剂是如下融合蛋白,其包含融合至Fc结构域的FLRG多肽的激活素结合部分。

[0344] 8. 筛选测定

[0345] 在某些方面中,本公开文本涉及ActRII多肽、ALK4多肽和/或ALK4:ActRIIB异多聚体鉴定作为ActRII拮抗剂的化合物(药剂)的用途。在其他方面中,本公开文本涉及TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖多肽鉴定作为TGF $\beta$ 拮抗剂的化合物(药剂)的用途。可以测试通过这种筛选鉴定的化合物以评估其调节诸如骨、软骨、肌肉、脂肪和/或神经元等组织的能力,以评估其在体内或体外调节组织生长的能力。可以在例如动物模型中测试这些化合物。

[0346] 存在多种方法用于通过靶向TGF $\beta$ 超家族配体信号传导(例如,SMAD信号传导)来筛选调节组织生长的治疗剂。在某些实施方案中,可以进行化合物的高通量筛选以鉴定扰乱TGF $\beta$ 超家族受体介导的对所选细胞系的影响的药剂。在某些实施方案中,进行所述测定以筛选并鉴定特异性抑制或降低ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与结合配偶体的结合的化合物,所述结合配偶体包括例如BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素AC、nodal1、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋

白、阿特敏蛋白、普塞芬蛋白、MIS和Lefty。可替代地，所述测定可以用于鉴定增强ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与诸如配体等结合配偶体的结合的化合物。在另一实施方案中，所述化合物可以通过其与ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖相互作用的能力来鉴定。

[0347] 多种测定形式将足够，并且根据本公开文本，本领域普通技术人员将理解本文未明确描述的那些。如本文所述，本发明的测试化合物(药剂)可以通过任何组合化学方法产生。可替代地，主题化合物可以是在体内或在体外合成的天然存在的生物分子。要针对充当组织生长调节剂的能力加以测试的化合物(药剂)可以例如由细菌、酵母、植物或其他生物产生(例如，天然产物)，化学地产生(例如，小分子，包括肽模拟物)，或重组地产生。本发明考虑的测试化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、肽模拟物、糖、激素和核酸分子。在某些实施方案中，测试剂是分子量低于约2,000道尔顿的有机小分子。

[0348] 本公开文本的测试化合物可以作为单个的离散实体提供，或者在复杂性较高的文库中提供，如通过组合化学来制备。这些文库可以包含例如醇、烷基卤、胺、酰胺、酯、醛、醚和其他种类的有机化合物。尤其是在初始筛选步骤中，测试化合物可以按分离的形式或作为化合物的混合物被呈递至测试系统。任选地，所述化合物可以任选地用其他化合物衍生化并具有促进化合物分离的衍生化基团。衍生化基团的非限制性例子包括生物素、荧光素、地高辛、绿色荧光蛋白、同位素、多组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、光可激活的交联剂或其任何组合。

[0349] 在测试化合物和天然提取物的文库的许多药物筛选程序中，需要高通量测定以使在给定时间段中观测的化合物的数目最大化。在无细胞系统(如可以用纯化的或半纯化的蛋白质衍生的)中进行的测定通常优选作为“主要”筛选，因为它们可以产生以允许快速发展并且相对容易地检测到由测试化合物介导的分子靶标中的改变。此外，测试化合物的细胞毒性或生物利用度的影响在体外系统中通常可以忽略，所述测定代之主要集中于药物对分子靶标的影响，所述影响可以表现在ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与结合配偶体的结合亲和力的改变方面，所述结合配偶体包括例如BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素AC、nodal1、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、阿特敏蛋白、普塞芬蛋白、MIS和Lefty。

[0350] 仅用于说明，在本公开文本的示例性筛选测定中，如对于测定的意图合适的，使所关注化合物与分离并纯化的通常能够结合至TGF $\beta$ 超家族配体的ALK4:ActRIIB异多聚体接触。然后向所述化合物与ALK4:ActRIIB异多聚体的混合物中添加含有适当配体(例如，BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、nodal1、神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、阿特敏蛋白、普塞芬蛋白、MIS和Lefty)的组合物。对异多聚体-超家族配体复合物的检测和定量提供了确定化合物在抑制(或增强)ALK4:ActRIIB异多聚体与其结合蛋白之间的复合物形成方面的功效的手段。所述化合物的功效可以通过从使用各种浓度的测试化合物获得的数据产生剂量-反应曲线来评估。此外，还可以进行对照测

定以提供用于比较的基线。例如，在对照测定中，将分离并纯化的配体添加至含有ALK4:ActRIIB异多聚体的组合物中，并且在测试化合物不存在下对异多聚体-配体复合物的形成进行定量。应理解，通常，可以改变可共混反应物的顺序，并且可以同时共混。此外，代替纯化的蛋白质，细胞提取物和溶解产物可以用于提供适合的无细胞测定系统。

[0351] ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与另一种蛋白质的结合可以通过多种技术来检测。例如，复合物形成的调节可以使用例如可检测标记的蛋白质通过免疫测定或通过色谱检测来定量，所述可检测标记的蛋白质是如放射性标记的（例如， $^{32}$ P、 $^{35}$ S、 $^{14}$ C或 $^3$ H）、荧光标记的（例如，FITC）或酶标记的ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖和/或结合蛋白。

[0352] 在某些实施方案中，本公开文本考虑了在直接或间接测量ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与结合蛋白之间的相互作用程度中使用荧光偏振测定和荧光共振能量转移(FRET)测定。另外，其他检测模式（如基于光学波导(PCT公开案W096/26432和美国专利号5,677,196)、表面等离子体共振(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器的那些）与本公开文本的许多实施方案兼容。

[0353] 此外，本公开文本考虑了使用相互作用阱测定（也称为“双杂交测定”）鉴定破坏或增强ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与结合配偶体之间的相互作用的药剂。参见例如，美国专利号5,283,317；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；和Iwabuchi等人(1993)Oncogene 8:1693-1696。在一个具体实施方案中，本公开文本考虑了使用反向双杂交系统鉴定解离ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖与结合蛋白之间的相互作用的化合物（例如，小分子或肽）[Vidal和Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal和Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81；和美国专利号5,525,490; 5,955,280; 和5,965,368]。

[0354] 在某些实施方案中，主题化合物是通过其与ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖相互作用的能力来鉴定。化合物与ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖之间的相互作用可以是共价或非共价的。例如，这种相互作用可以在蛋白质水平上使用体外生物化学方法来鉴定，所述方法包括光交联、放射性标记配体结合和亲和色谱[Jakoby WB等人(1974)Methods in Enzymology 46:1]。在某些情况下，可以在基于机制的测定中筛选所述化合物，所述测定是如检测结合至ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖的化合物的测定。这可以包括固相或流体相结合事件。可替代地，可以用报告系统（例如， $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶或绿色荧光蛋白）将编码ActRII多肽、ALK4多肽、ALK4:ActRIIB异多聚体、TGF $\beta$ RII多肽、ALK5多肽和/或 $\beta$ 聚糖的基因转染至细胞中，并且优选地通过高通量筛选或用文库的单独成员针对文库进行筛选。可以使用其他基于机制的结合测定；例如，检测自由能变化的结合测定。结合测定可以用固定至孔、珠或芯片或通过固定化抗体捕获的靶标进行或通过毛细管电泳进行解析。通常可以使用比色终点或荧光或表面等离子体共振来检测已结合的化合物。

[0355] 9.示例性治疗用途

[0356] 如本文所述,发现单独的或组合的ActRII拮抗剂(抑制剂)和TGF $\beta$ 拮抗剂对在癌症患者中降低肿瘤负担和延长存活时间具有令人惊讶的效果。因此,本公开文本部分地提供了单独地或组合地以及任选地与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合地使用ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂治疗癌症、特别是治疗或预防癌症的一种或多种并发症(例如,降低肿瘤负担)的方法。另外,数据指示,ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂疗法的功效依赖于免疫系统。因此,部分地,本公开文本涉及以下发现:单独的或组合的ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂可以用作免疫治疗药,特别是用于治疗众多的癌症(例如,与免疫抑制和/或免疫耗竭相关的癌症)。与其他已知的免疫-肿瘤学药剂一样,ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂增强患者的免疫应答的能力可以具有超出癌症领域的广泛得多的治疗意义。例如,已经提出,免疫增强剂可用于治疗众多的感染性疾病,特别是促进免疫抑制和/或免疫耗竭的病原剂。此类免疫增强剂还可用于加强疫苗(例如,病原体和癌症疫苗)的免疫功效。因此,本公开文本提供了多种ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂,其可以单独地或任选地与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合地用于提高有需要的受试者的免疫应答,治疗癌症,治疗感染性疾病,和/或提高疫苗接种/免疫的功效。

[0357] 本文所描述和要求保护的方法和单独的或组合的ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂可以用于治疗恶性或恶变前病症以及防止进展至肿瘤或恶性状态,包括但不限于本文所述的那些障碍。此类用途指示于已知或怀疑先前进展至瘤形成或癌症的病症中,特别是其中已经发生由增生、化生或最特别地发育不良组成的非肿瘤细胞生长。

[0358] 如本文所用,“预防”障碍或病症的治疗剂是指如下化合物,其在统计学样品中,相对于未治疗的对照样品降低所治疗样品中的障碍或病症的发生率,或者相对于未治疗的对照样品延迟障碍或病症的一种或多种症状的发作或降低其严重程度。

[0359] 如本文所用的术语“治疗”包括一旦确诊就改善或消除病症。在任一种情况下,可以在医生或其他医疗服务人员提供的诊断和治疗剂的给予的预期结果中辨别预防或治疗。

[0360] 通常,如本公开文本中所述的对疾病或病症的治疗或预防是通过以有效量给予一种或多种ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂来实现的。药剂的有效量是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下有效实现所需的治疗或预防结果的量。本公开文本的药剂的治疗有效量可以根据诸如以下等因素而变:疾病状态、个体的年龄、性别和体重以及药剂诱发个体的所需反应的能力。预防有效量是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下有效实现所需的预防结果的量。

[0361] 通常,“肿瘤”是指良性和恶性癌症、以及休眠肿瘤。通常,“癌症”是指原发性恶性细胞或肿瘤(例如,其细胞尚未移行至受试者体内除了初始恶性肿瘤或肿瘤的位点以外的位点的那些)和继发性恶性细胞或肿瘤(例如,因转移产生的那些,转移即恶性细胞或肿瘤细胞移行至不同于初始肿瘤位点的继发性位点)。转移可以是局部的或远端的。除了监测特殊症状以外,转移最常通过以下技术的单独或组合使用来检测:磁共振成像(MRI)扫描、计算机断层摄影(CT)扫描、血液和血小板计数、肝功能研究、胸部X射线、骨扫描及其组合。

[0362] 通常,免疫应答是指免疫系统的细胞(如B细胞、T细胞(CD4或CD8)、调控T细胞、抗原呈递细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、NKT细胞、NK细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞或嗜中性粒细胞)对刺激的应答。在一些实施方案中,所述应答对特定抗原具有特异性(“抗原特异性应答”),并且是指CD4T细胞、CD8T细胞或B细胞通过其抗原特异性受体进行的应答。在一些实施方案中,免疫应答是T细胞应答,如CD4+应答或CD8+应答。这些细胞的此类

应答可以包括例如细胞毒性、增殖、细胞因子或趋化因子产生、运输或吞噬作用，并且可能依赖于正在经历应答的免疫细胞的性质。免疫应答可以导致对侵入病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞或其他异常细胞或者在自身免疫或病理性炎症情况下的正常细胞或组织的选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或从身体消除。

[0363] 宿主免疫应答的免疫抑制在多种慢性免疫病症中起作用，如在持续性感染和肿瘤免疫抑制中。如本文所用，关于免疫系统的“无应答性”或“功能性耗竭”通常是指免疫细胞对刺激（如通过激活受体或细胞因子刺激）的折射性。无应答性可能例如由于暴露于免疫抑制剂、暴露于高或恒定剂量的抗原或通过抑制剂受体（如PD-1或TIM-3）的活性而发生。如本文所用，术语“无应答性”包括对激活刺激的折射性。这种折射性通常是抗原特异性的并且在抗原暴露停止后持续。相对于相同类型的相对对照免疫细胞，无应答的免疫细胞可能具有细胞毒性活性、细胞因子产生、增殖、运输、吞噬活性或其任何组合的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至100%的降低。

[0364] 通常，免疫疗法是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式修饰免疫应答的方法治疗患有疾病或者有感染疾病或遭受疾病复发风险的受试者。

[0365] 通常，增强免疫应答是指激活或提高受试者体内现有免疫应答的有效性或效力。有效性和效力的这种激活或提高可以例如通过以下方式来实现：克服抑制内源宿主免疫应答的机制或者刺激激活/增强内源宿主免疫应答的机制。

[0366] 本公开文本的单独的或组合的ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂可以用于治疗多种形式的癌症，包括但不限于膀胱、乳腺、结肠、肾、肝、肺、卵巢、宫颈、胰腺、直肠、前列腺、胃、表皮的癌症；淋巴系或骨髓系的造血系统肿瘤；间质来源的肿瘤，如纤维肉瘤或横纹肌肉瘤；其他肿瘤类型，如黑色素瘤、畸胎癌、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、腺癌和非小细胞肺癌。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、肉瘤和白血病、骨髓瘤或淋巴性恶性肿瘤。此类癌症的更具体的例子记录于下文中并且包括：鳞状细胞癌（例如，上皮鳞状细胞癌）、尤因肉瘤、维尔姆斯瘤、星形细胞瘤、肺癌（包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌）、腹膜癌、肝细胞癌、胃（gastric或stomach）癌（包括胃肠癌）、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、肝细胞癌、肝细胞癌、神经内分泌肿瘤、甲状腺髓样癌、分化型甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾（kidney或renal）癌、前列腺癌、外阴癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。

[0367] 癌症或恶性肿瘤的其他例子包括但不限于：急性儿童淋巴母细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓样白血病、肾上腺皮质癌、成人（原发性）肝细胞癌、成人（原发性）肝癌、成人急性淋巴细胞白血病、成人急性髓样白血病、成人霍奇金淋巴瘤、成人淋巴细胞白血病、成人非霍奇金淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS相关淋巴瘤、AIDS相关恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳腺癌、肾盂和输尿管癌症、中枢神经系统（原发性）淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童（原发性）肝细胞癌、儿童（原发性）肝癌、儿童急性淋巴母细胞性白血病、儿童急性髓样白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童颅外生殖细胞瘤、儿童霍奇金病、儿童霍奇金淋巴瘤、儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤、儿童淋巴母细胞性白血病、儿童髓母细胞瘤、儿童非霍奇金淋巴瘤、儿童松果体和幕上原发性神经外胚层肿瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉

瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食管癌、尤因肉瘤和相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳腺癌、高歇氏病、胆囊癌、胃癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠肿瘤、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性障碍、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、原发灶不明转移性鳞状颈癌 (Metastatic Occult Primary Squamous Neck Cancer)、转移性原发性鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、骨髓增生异常综合征、髓性白血病、髓样白血病、骨髓增生性障碍、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、原发灶不明转移性鳞状颈癌 (Occult Primary Metastatic Squamous Neck Cancer)、口咽癌、骨肉瘤/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维性组织细胞瘤、骨的骨肉瘤/恶性纤维性组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低度恶性潜能肿瘤、胰腺癌、副蛋白血症、甲状腺旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、结节病肉瘤、塞扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、胃癌、幕上原发性神经外胚层和松果体肿瘤、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、移行性肾盂和输尿管癌症、滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、维尔姆斯瘤以及除了瘤形成以外位于上文所列器官系统中的任何其他过度增生性疾病。

[0368] 发育不良通常是癌症的先兆，并且主要发现于上皮细胞中。它是非肿瘤细胞生长的最紊乱的形式，涉及单独细胞均匀性和细胞的构造取向的丧失。发育不良特有地在存在慢性刺激或炎症的地方发生。在一些实施方案中，任选地与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合的ActRII拮抗剂可以用于治疗发育不良障碍。发育不良障碍包括但不限于无汗性外胚层发育不良、前颜面发育不良、窒息性胸廓发育不良、心房-手指 (atriodigital) 发育不良、支气管肺发育不良、大脑发育不良、宫颈发育不良、软骨外胚层发育不良、锁骨颅骨发育不良、先天性外胚叶发育不良、颅骨骨干发育不良、颅腕跖骨 (Craniocarpotarsal) 发育不良、颅骨干骺端发育不良、牙本质发育不良、骨干发育不良、外胚层发育不良、牙釉质发育不良、脑眼发育不良、半肢骨骺发育不良、多发性骨骺发育不良、点状骨骺发育不良、上皮发育不良、面-指-生殖器 (faciodigitogenital) 发育不良、家族性颌骨纤维性发育不良、家族性白色皱襞性发育不良、纤维肌性发育不良、骨纤维性发育不良、旺盛骨性发育不良、遗传性肾脏-视网膜发育不良、有汗性外胚层发育不良、少汗性外胚层发育不良、少淋巴球性胸腺发育不良、乳腺发育不良、下颌骨颜面发育不良、干骺端发育不良、蒙迪尼 (Mondini) 发育不良、单骨纤维性发育不良、粘膜上皮发育不良、多发性骨骺发育不良、眼耳脊椎发育不良、眼齿指发育不良、眼脊椎发育不良、牙源性发育不良、眼下颚 (ophthalmomandibulomelic) 发育不良、根尖周牙骨质发育不良、多骨纤维性发育不良、假性软骨发育不良性椎骺发育不良、视网膜发育不良、中隔-视神经发育不良、椎骺发育不良和心室径向发育不良。

[0369] 可以用任选地与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂治疗的其他肿瘤前障碍包括但不限于良性增生异常障碍(例如,良性肿瘤、纤维囊性病症、组织肥大、肠息肉或腺瘤和食管发育不良)、白斑、角化病、鲍文病、农民皮肤(Farmer's Skin)、日光性唇炎和日光性角化病。

[0370] 可以用任选地与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂治疗的其他过度增生性疾病、障碍和/或病症包括但不限于恶性肿瘤和相关障碍的进展和/或转移,如白血病(包括急性白血病(例如,急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病(包括成髓细胞性、前髓细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病))和慢性白血病(例如,慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病))、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,包括但不限于肉瘤和癌,如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞癌、髓母细胞癌、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞癌、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0371] 在某些方面中,癌症治疗剂可以与一种或多种ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂组合使用,所述癌症治疗剂是如细胞毒性剂、抗血管生成剂、促凋亡剂、免疫调节剂、抗生素、激素、激素拮抗剂、趋化因子、药物、前药、毒素、酶或其他活性剂。所用药物可以具有选自例如以下的药学特性:抗有丝分裂剂、抗激酶、烷基化剂、抗代谢物、抗生素、生物碱、抗血管生成剂、促凋亡剂及其组合。

[0372] 如本文所用,“与……组合”、“联合给予”、“联合地”是指任何形式的给予,使得其他疗法(例如,第二、第三、第四等)在体内仍然有效(例如,多种化合物在患者体内同时有效,这可以包括那些化合物的协同效应)。有效性可能与药剂在血液、血清或血浆中的可测量浓度无关。例如,不同的治疗化合物可以在相同的制剂中或在单独的制剂中同时或依次给予,并且可以按不同的时间表给予。因此,接受这种治疗的个体可以受益于不同疗法的组合作用。本公开文本的一种或多种ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂可以与一种或多种其他另外的药剂和/或支持疗法并行给予、在所述一种或多种其他另外的药剂和/或支持疗法之前或之后给予。通常,每种治疗剂将以针对该特定药剂确定的剂量和/或时间表来给予。要在方案中使用的特定组合将考虑本公开文本的拮抗剂与疗法和/或期望的相容性。

[0373] 示例性的所用药物可以包括但不限于氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普里汀(aplidin)、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环、阿西替尼(axitinib)、氨鲁米特、安吖啶、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、布舍瑞林、硼替佐米、博舒替尼、比卡鲁胺、苔藓虫素-1、白消安、卡培他滨、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、西乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂(CDDP)、Cox-2抑制剂、伊立替康(CPT-11)、SN-38、克拉屈滨、喜树碱、克唑替尼、秋水仙碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、环丙孕酮、氯膦酸盐、达卡巴嗪、达沙替尼、己二烯雌酚、地纳利布(dinaciclib)、多西他赛、更生霉素、道诺霉素、己烯雌酚、多柔比星、2-吡咯啉基多柔比星(2P-DOX)、氟基-吗啉代多柔比星、多柔比星葡萄糖苷酸、表柔比星葡萄糖苷酸、厄洛替尼、雌莫

司汀、表鬼臼毒素(epidophyllotoxin)、厄洛替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊昔(VP16)、依托泊昔葡萄糖苷酸、磷酸依托泊昔、依西美坦、非格司亭、芬戈莫德、氟尿昔(FUDR)、氟甲睾酮、3',5'-O-二油酰基-FudR(FUDR-d0)、氟氢可的松、氟达拉滨、氟他胺、戈舍瑞林、法尼基蛋白转移酶抑制剂、夫拉平度(flavopiridol)、福他替尼(fostamatinib)、格尼特匹(ganetespib)、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼、伊达比星、左旋咪唑、艾代拉利司(idelalisib)、异环磷酰胺、伊马替尼、来曲唑、天冬酰胺酶、亮丙瑞林、拉帕替尼、来那度胺、醛氢叶酸(leucovorin)、伊立替康、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、6-巯嘌呤、甲地孕酮、甲氨蝶呤、米托蒽醌、尼鲁米特、光辉霉素、丝裂霉素、诺考达唑、奥曲肽、米托坦、诺维苯、来那替尼、尼罗替尼、亚硝基脲(nitrosourea)、奥拉帕尼、普卡霉素(plicomycin)、丙卡巴肼、紫杉醇、奥沙利铂、PCI-32765、喷司他丁、普卡霉素、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉菲尼、链脲菌素、SU11248、舒尼替尼、他莫昔芬、叶菲尔钠、替莫唑胺、美司钠、替莫唑胺(DTIC的水性形式)、反铂、沙立度胺、硫鸟嘌呤、雷替曲塞、塞替派、替尼泊昔、拓扑替康、尿嘧啶氮芥、瓦他拉尼、长春瑞滨、长春花碱、利妥昔单抗、帕米膦酸二钠、长春新碱、长春花生物碱和ZD1839。

[0374] 所用毒素可以包括蓖麻毒素、相思豆毒素、 $\alpha$ 毒素、皂草素、核糖核酸酶(RNA酶)(例如,豹蛙酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌(Pseudomonas)外毒素和假单胞菌内毒素。

[0375] 所用趋化因子可以包括RANTES、MCAF、MIP 1- $\alpha$ 、MIP 1- $\beta$ 和IP-10。

[0376] 在某些实施方案中,抗血管生成剂可以与一种或多种ActRII拮抗剂组合使用,所述抗血管生成剂是如血管抑素、baculostatin、血管能抑素、马西平(maspin)、抗VEGF抗体、抗PIGF肽和抗体、抗血管生长因子抗体、抗F1k-1抗体、抗F1t-1抗体和肽、抗Kras抗体、抗cMET抗体、抗MIF(巨噬细胞移动抑制因子)抗体、层粘连蛋白肽、纤连蛋白肽、纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂、组织金属蛋白酶抑制剂、干扰素、白介素-12、IP-10、Gro- $\beta$ 、血小板反应素、2-甲氧基雌二醇、增殖蛋白相关蛋白、羧胺三唑(carboxiamidotriazole)、CM101、马立马司他(Marimastat)、戊聚糖多硫酸盐、血管生成素-2、干扰素- $\alpha$ 、除莠霉素A、PNU145156E、16K泌乳素片段、利诺胺(Linomide)(罗喹美克)、沙利度胺、己酮可可碱、染料木黄酮、TNP-470、内皮抑素、紫杉醇、阿卡丁(accutin)、血管抑素、西多福韦、长春新碱、博来霉素、AGM-1470、血小板因子4、ALK1多肽(例如,达特西普(dalantercept))或米诺环素。

[0377] 所用免疫调节剂可以选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、促红细胞生成素、血小板生成素及其组合。特别有用的是淋巴毒素(如肿瘤坏死因子(TNF))、成血因子(如白介素(IL))、集落刺激因子(如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))、干扰素(如干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 或干扰素- $\lambda$ )和干细胞生长因子(如名为“S1因子”的干细胞生长因子)。细胞因子中包括生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酸人生长激素和牛生长激素;甲状腺素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和黄体化激素(LH);肝生长因子;前列腺素、成纤维细胞生长因子;泌乳素;胎盘催乳激素、OB蛋白;肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和肿瘤坏死因子- $\beta$ ;苗勒管抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- $\beta$ ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- $\alpha$ 和TGF $\beta$ ;胰岛素样生长因子-I和胰岛

素样生长因子-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 和干扰素- $\gamma$ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);白介素(IL),如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12;IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25;LIF、kit-配体或FLT-3、血管抑素、血小板反应素、内皮抑素、肿瘤坏死因子和LT。

[0378] 所用放射性核素包括但不限于 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{194}\text{Ir}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{211}\text{Pb}$ 和 $^{227}\text{Th}$ 。治疗性放射性核素的衰变能优选地在20至6,000keV范围内,优选地对于俄歇发射体在60至200keV范围内,对于 $\beta$ 发射体在100-2,500keV范围内,并且对于 $\alpha$ 发射体在4,000-6,000keV范围内。有用的 $\beta$ 粒子发射核素的最大衰变能优选地为20-5,000keV,更优选地100-4,000keV,并且最优选地500-2,500keV。同样优选的是伴随俄歇发射粒子显著衰变的放射性核素。例如,Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m和Ir-192。有用的 $\beta$ 粒子发射核素的衰变能优选地<1,000keV,更优选地<100keV,并且最优选地<70keV。同样优选的是伴随 $\alpha$ 粒子产生显著衰变的放射性核素。此类放射性核素包括但不限于:Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Th-227和Fm-255。有用的 $\alpha$ 粒子发射放射性核素的衰变能优选地为2,000-10,000keV,更优选地3,000-8,000keV,并且最优选地4,000-7,000keV。所用的其他潜在放射性同位素包括 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ 、 $^{126}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{105}\text{Ru}$ 、 $^{107}\text{Hg}$ 、 $^{203}\text{Hg}$ 、 $^{121}\text{mTe}$ 、 $^{122}\text{mTe}$ 、 $^{125}\text{mTe}$ 、 $^{165}\text{Tm}$ 、 $^{167}\text{Tm}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{113}\text{mIn}$ 、 $^{95}\text{Ru}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{168}\text{Tm}$ 、 $^{197}\text{Pt}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 和 $^{169}\text{Yb}$ 。

[0379] 在一些实施方案中,ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂是与以下组合使用:至少一种烷基化剂、亚硝基脲、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、蒽环、皮质类固醇激素、性激素和/或靶向的抗肿瘤化合物。

[0380] 靶向的抗肿瘤化合物是设计为比标准化学疗法药物可以达到的更特异性地攻击癌细胞的药物。这些化合物大多攻击具有某些基因的突变的细胞或者过表达这些基因的拷贝的细胞。在一个实施方案中,抗肿瘤化合物可以是伊马替尼(格列卫)、吉非替尼(易瑞沙)、厄洛替尼(特罗凯)、利妥昔单抗(美罗华)或贝伐单抗(阿瓦斯汀)。

[0381] 烷基化剂直接作用于DNA以防止癌细胞增殖。这些药剂对细胞周期的任何特定阶段没有特异性。在一个实施方案中,烷基化剂可以选自白消安、顺铂、卡铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、达卡巴嗪(DTIC)、氮芥(mechlorethamine)(氮芥(nitrogen mustard))、美法仑和替莫唑胺。

[0382] 抗代谢物构成干扰DNA和RNA合成的药物类别。这些药剂在细胞周期的S期期间发挥作用,并且一般用于治疗白血病、乳腺、卵巢和胃肠道的肿瘤、以及其他癌症。在一个实施方案中,抗代谢物可以是5-氟尿嘧啶、卡培他滨、6-巯嘌呤、甲氨蝶呤、吉西他滨、阿糖胞苷(ara-C)、氟达拉滨或培美曲塞。

[0383] 拓扑异构酶抑制剂是干扰在DNA复制中重要的拓扑异构酶的药物。拓扑异构酶I抑制剂的一些例子包括拓扑替康和伊立替康,而拓扑异构酶II抑制剂的一些代表性例子包括依托泊苷(VP-16)和替尼泊苷。

[0384] 蕤环也是干扰参与DNA复制的酶的化学疗法药物。这些药剂作用于细胞周期的所有阶段，并且因此广泛地用作多种癌症的治疗。在一个实施方案中，关于本发明使用的蒽环可以是道诺霉素、多柔比星(亚德里亚霉素(Adriamycin))、表柔比星、伊达比星或米托蒽醌。

[0385] 特别是在对肿瘤抗原具有特异性的T细胞中，肿瘤可以通过笼络某些免疫检查点途径而逃避免疫监督(Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264)。使用检查点抑制剂抗体用于癌症治疗的研究已经成功治疗先前认为抵抗癌症治疗的癌症(参见例如,Ott和Bhardwaj, 2013, Frontiers in Immunology 4:346; Menzies和Long, 2013, Ther Adv Med Oncol 5:278-85; Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-64; Mavilgio和Lugli)。与大多数抗癌剂相反，检查点抑制剂不直接靶向肿瘤细胞，而是靶向淋巴细胞受体或其配体以增强免疫系统的内源抗肿瘤活性。(Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264)。由于此类抑制剂主要通过调控针对患病细胞、组织或病原体的免疫应答来发挥作用，其可以与其他治疗方式(如主题ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂、ADC和/或干扰素)组合使用，以增强此类药剂的抗肿瘤作用。

[0386] 抗PD1抗体已经用于治疗黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、前列腺癌、结肠直肠癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、白血病、淋巴瘤和肾细胞癌(Topalian等人, 2012, N Engl J Med 366:2443-54; Lipson等人, 2013, Clin Cancer Res 19:462-8; Berger等人, 2008, Clin Cancer Res 14:3044-51; Gildener-Leapman等人, 2013, Oral Oncol 49:1089-96; Menzies 和Long, 2013, Ther Adv Med Oncol 5:278-85)。示例性抗PD1抗体包括兰布鲁珠单抗(lambrolizumab) (MK-3475, MERCK)、纳武单抗(BMS-936558, Bristol-Myers Squibb)、AMP-224 (Merck) 和匹利珠单抗(pidilizumab) (CT-011, Curetech Ltd.)。抗PD1抗体可从例如ABCAM (AB137132)、Biolegend (EH12.2H7、RMP1-14) 和Affymetrix Ebioscience (J105、J116、MIH4) 商购。

[0387] 抗CTL4A抗体已经在临床试验中用于治疗黑色素瘤、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(Robert和Ghiringhelli, 2009, Oncologist 14:848-61; Ott等人, 2013, Clin Cancer Res 19:5300; Weber, 2007, Oncologist 12:864-72; Wada等人, 2013, J Transl Med 11:89)。示例性抗CTLA4抗体包括伊匹单抗(Bristol-Myers Squibb) 和曲美木单抗(tremelimumab) (Pfizer)。抗PD1抗体可从例如ABCAM (AB134090)、Sino Biological Inc. (11159-H03H、11159-H08H) 和Thermo Scientific Pierce (PA5-29572、PA5-23967、PA5-26465、MA1-12205、MA1-35914) 商购。伊匹单抗最近获得FDA批准用于治疗转移性黑色素瘤(Wada等人, 2013, J Transl Med 11:89)。

[0388] 虽然针对CTLA4、PD1和PD-L1的检查点抑制剂在临幊上最先进，但是其他潜在的检查点抗原是已知的并且可以用作与主题ActRII拮抗剂组合的治疗性抑制剂的靶标，所述检查点抗原是如LAG3、B7-H3、B7-H4和TIM3(Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264)。刺激针对肿瘤和/或病原体的免疫应答的这些和其他已知药剂可以与ActRIIa拮抗剂组合使用，所述ActRIIa拮抗剂是单独的或者与干扰素(如干扰素- $\alpha$ ) 和/或抗体-药物缀合物进一步组合，用于改善的癌症疗法。可以组合使用的其他已知的共刺激途径调节剂包括但不限于阿托莫德(agatolimod)、贝拉西普(belatacept)、博纳吐单抗(blinatumomab)、CD40配体、抗B7-1抗体、抗B7-2抗体、抗B7-H4抗体、AG4263、依立托伦(eritoran)、抗OX40抗

体、ISF-154和SGN-70、B7-1、B7-2、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD48、LFA-3、CD30配体、CD40配体、耐热抗原、B7h、OX40配体、LIGHT、CD70和CD24。

[0389] 治疗剂可以包括光活性剂或染料。荧光组合物(如荧光染料)和其他对可见光敏感的色原体或染料(如卟啉)已经用于通过将适合的光引导至病灶来检测和治疗病灶。在治疗中,已经将这种方式命名为光辐射、光疗法或光动力疗法。参加Joni等人(编辑),PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985);vanden Bergh,Chem.Britain(1986),22:430。此外,已经将单克隆抗体与光激活的染料偶联以实现光疗法。参见Mew等人,J.Immunol.(1983),130:1473;出处同前,Cancer Res.(1985),45:4380;Oseroff等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1986),83:8744;出处同前,Photochem.Photobiol.(1987),46:83;Hasan等人,Prog.Clin.Biol.Res.(1989),288:471;Tatsuta等人,Lasers Surg.Med.(1989),9:422;Pelegrin等人,Cancer(1991),67:2529。

[0390] 其他的有用治疗剂可以包含寡核苷酸,尤其是优选地针对癌基因和癌基因产物的反义寡核苷酸,如bcl-2或p53。治疗性寡核苷酸的优选形式是siRNA。技术人员应认识到,任何siRNA或干扰RNA种类都可以附接至抗体或其片段以递送至所靶向组织。针对众多的靶标的许多siRNA种类是本领域已知的,并且任何这种已知的siRNA都可以用于所要求保护的方法和组合物中。

[0391] 潜在使用的已知siRNA种类包括对以下具有特异性的那些siRNA:IKK- $\gamma$ (美国专利号7,022,828);VEGF、Flt-1和Flk-1/KDR(美国专利号7,148,342);Bc12和EGFR(美国专利号7,541,453);CDC20(美国专利号7,550,572);转导素( $\beta$ )样3(美国专利号7,576,196);KRAS(美国专利号7,576,197);碳酸酐酶II(美国专利号7,579,457);补体组分3(美国专利号7,582,746);白介素-1受体相关激酶4(IRAK4)(美国专利号7,592,443);存活素(美国专利号7,608,7070);超氧化物歧化酶1(美国专利号7,632,938);MET原癌基因(美国专利号7,632,939);淀粉样蛋白 $\beta$ 前体蛋白(APP)(美国专利号7,635,771);IGF-1R(美国专利号7,638,621);ICAM1(美国专利号7,642,349);补体因子B(美国专利号7,696,344);p53(美国专利号7,781,575)和载脂蛋白B(美国专利号7,795,421),将每个参考专利的实施例部分都通过引用并入本文。

[0392] 其他siRNA种类可从已知的商业来源获得,如Sigma-Aldrich(圣路易斯,密苏里州)、Invitrogen(卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Santa Cruz Biotechnology(圣克鲁兹,加利福尼亚州)、Ambion(奥斯汀,德克萨斯州)、Dharmacon(Thermo Scientific,拉斐特,科罗拉多州)、Promega(麦迪逊,威斯康辛州)、Mirus Bio(麦迪逊,威斯康辛州)和Qiagen(巴伦西亚,加利福尼亚州)以及许多其他公司。siRNA种类的其他可公开获得的来源包括Stockholm Bioinformatics Centre的siRNADB数据库、MIT/ICBP siRNA数据库、Broad Institute的RNAi Consortium shRNA文库和NCBI的Probe数据库。例如,在NCBI Probe数据库中有30,852个siRNA种类。技术人员应认识到,对于任何所关注基因,siRNA种类或者已经设计,或者可以使用可公开获得的软件工具容易地设计。任何此类siRNA种类都可以使用主题DNL.TM.复合物来递送。

[0393] ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂免疫疗法在与疫苗接种方案组合时可能更有效。已经设计了许多用于针对肿瘤进行疫苗接种的实验策略(参见Rosenberg,S.,2000,Development of Cancer Vaccines,ASCO Educational Book Spring:60-62;Logothetis,C.,2000,ASCO

Educational Book Spring:300–302;Khayat,D.2000,ASCO Educational Book Spring:414–428;Foon,K.2000,ASCO Educational Book Spring:730–738;还参见Restifo,N.和Sznol,M.,Cancer Vaccines,第61章,第3023–3043页在DeVita,V.等人(编辑),1997,Cancer:Principles and Practice of Oncology.第五版)。在这些策略之一中,使用自体或同种异体肿瘤细胞制备疫苗。已经显示在转导肿瘤细胞以表达GM-CSF时,这些细胞疫苗具有提高的有效性(Dranoff等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:3539–43)。因此,在一些实施方案中,一种或多种ActRII拮抗剂可以与免疫原性剂组合,所述免疫原性剂是如癌性细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞和用编码免疫刺激细胞因子的基因转染的细胞(He等人(2004)J.Immunol.173:4919–28)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性例子包括黑色素瘤抗原的肽(如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽)或转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。

[0394] 在各种肿瘤中进行的对基因表达和大规模基因表达模式的研究已经产生了所谓肿瘤特异性抗原的定义(Rosenberg,S.A.(1999)Immunity 10:281–7)。在许多情况下,这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤和肿瘤产生的细胞中表达的分化抗原,例如黑素细胞抗原gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是,许多这些抗原可以显示为宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。PD-L1阻断可以与肿瘤中表达的重组蛋白和/或肽的集合结合使用,以产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质通常被免疫系统视为自身抗原,并且因此可被免疫系统耐受。肿瘤抗原还可以包括蛋白质端粒酶,其是染色体的端粒合成所需的并且在超过85%的人类癌症中以及仅在有限数目的体细胞组织中表达(Kim,N等人(1994)Science 266:2011–2013)。可以通过多种手段保护这些体细胞组织免受免疫攻击。肿瘤抗原还可以是由于体细胞突变在癌细胞中表达的“新抗原”或来自B细胞肿瘤的独特型,所述体细胞突变改变蛋白质序列或产生两个无关序列之间的融合蛋白(例如,费城染色体中的ber-abl)。

[0395] 其他肿瘤疫苗可以包括来自人类癌症中所涉及的病毒的蛋白质,所述病毒是如人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波西疱疹肉瘤病毒(KHSV)。可以与ActRII拮抗剂疗法结合使用的肿瘤特异性抗原的另一种形式是从肿瘤组织自身分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段,并且这些HSP高效地递送至抗原呈递细胞以供诱发肿瘤免疫(Suot,R和Srivastava,P(1995)Science 269:1585–1588;Tamura,Y.等人(1997)Science 278:117–120)。

[0396] 树突细胞(DC)是有效力的抗原呈递细胞,其可以用于引发抗原特异性反应。DC可以离体产生并加载各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle,F.等人(1998)Nature Medicine 4:328–332)。DC还可以通过遗传手段转导以也表达这些肿瘤抗原。出于免疫目的,还已经将DC直接融合至肿瘤细胞(Kugler,A.等人(2000)Nature Medicine 6:332–336)。作为疫苗接种方法,DC免疫可以与ActRII拮抗剂有效组合以激活更有效力的抗肿瘤反应。

[0397] 使用本公开文本的其他方法治疗已经暴露于特定毒素或病原体的患者。因此,本公开文本的另一个方面提供了治疗或预防受试者的感染性疾病(例如,病毒、细菌或寄生虫感染)的方法,其包括向有需要的受试者给予治疗有效量的一种或多种ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂,任选地进一步包括给予一种或多种其他支持疗法和/或活性剂用于治疗感染性疾病。在一些实施方案中,本公开文本提供了例如通过增强患有感染性疾病的受试者的内源免疫

应答来治疗受试者的感染性疾病的方法,其包括向受试者给予治疗有效量的一种或多种ActRII和/或TGFB拮抗剂,任选地进一步包括给予一种或多种其他支持疗法和/或活性剂用于治疗感染性疾病。

[0398] 感染性病毒的例子包括但不限于:逆转录病毒科;小RNA病毒科(例如,脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒(echovirus));杯状病毒科(如引起胃肠炎的毒株);披膜病毒科(例如,马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科(例如,登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒);冠状病毒科(例如,冠状病毒);弹状病毒科(例如,水疱性口炎病毒、狂犬病病毒);丝状病毒科(例如,埃波拉病毒);副粘液病毒科(例如,副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒);正粘病毒科(例如,流感病毒);布尼亞病毒科(例如,汉坦病毒、布尼亞病毒(bungavirus)、白蛉病毒和内罗毕病毒(Nairo virus));沙粒病毒科(Arenaviridae)(出血热病毒);呼肠病毒科(例如,呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒);双RNA病毒科(Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)(乙型肝炎病毒);细小病毒科(细小病毒);乳多空病毒科(乳头瘤病毒、多瘤病毒);腺病毒科(大多数腺病毒);疱疹病毒科(单纯疱疹病毒(HSV)1和HSV-2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒);痘病毒科(天花病毒、痘苗病毒、痘病毒);和虹彩病毒科(Iridoviridae)(如非洲猪瘟病毒);和未分类病毒(例如,海绵样脑病的病原、丁型肝炎的病原(认为是乙型肝炎病毒的缺陷型卫星)、非甲型非乙型肝炎的病原(1类=内部传播;2类=肠胃外传播(即,丙型肝炎);诺沃克病毒和相关病毒以及星状病毒)。考虑了本文所述的ActRII拮抗剂和方法用于治疗这些病毒剂的感染。因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了任选地与一种或多种支持疗法和/或活性剂组合地使用一种或多种ActRII拮抗剂治疗或预防病毒感染的方法,所述病毒感染包括例如AIDS、AIDS相关复合症、水痘、感冒、病毒性支气管炎、巨细胞病毒感染、科罗拉多蜱传热、登革热、埃博拉出血热、流行性腮腺炎、“手足口”病、肝炎、单纯疱疹、带状疱疹、HPV、流感(Flu)、拉沙热、麻疹、马尔堡出血热、感染性单核细胞增多症、流行性腮腺炎、脊髓灰质炎、进行性多病灶脑白质病、狂犬病、风疹、SARS、天花、病毒性脑炎、病毒性胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼罗病和黄热病。

[0399] 感染性细菌的例子包括但不限于:幽门螺杆菌(*Helicobacter pyloris*)、伯氏疏螺旋体(*Borelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophilia*)、分枝杆菌属物种(*Mycobacteria ssp.*)(如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansaii*)、戈登分枝杆菌(*M. gordonae*))、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)(A组链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)(B组链球菌)、链球菌属(草绿色组)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌属(厌氧型物种)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性弯曲杆菌属物种(*Campylobacter sp.*)、肠球菌属物种(*Enterococcus sp.*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、白喉棒杆菌(*corynebacterium diphtheriae*)、棒杆菌属物种(*corynebacterium sp.*)、红班丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌

(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀巴斯德菌 (*Pasturella multocida*)、拟杆菌属物种 (*Bacteroides sp.*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体 (*Treponema pertenue*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*) 和以色列放线菌 (*Actinomyces israelii*)。考虑了本文所述的ActRII组合物和方法用于治疗这些细菌剂的感染。因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了任选地与一种或多种支持疗法和/或活性剂组合地使用一种或多种ActRII拮抗剂治疗或预防细菌感染的方法,所述细菌感染包括例如炭疽、细菌性成人呼吸窘迫综合征、细菌性脑膜炎、布鲁杆菌病、弯曲菌病、猫抓病、支气管炎、霍乱、白喉、斑疹伤寒、淋病、军团杆菌病、麻风(汉森氏病)、钩端螺旋体病、李斯特菌病、莱姆病、类鼻疽、MRSA感染、分枝杆菌感染、脑膜炎、诺卡菌病、肾炎、肾小球肾炎、牙周病、百日咳 (*pertussis*) (百日咳 (Whooping Cough))、鼠疫、肺炎球菌性肺炎、鹦鹉热、Q热、洛矶山斑疹热 (RMSF)、沙门菌病、猩红热、志贺氏菌病、梅毒、脓毒性休克、血液动力学休克、脓毒症综合征、破伤风、沙眼、结核、土拉菌病、伤寒。

[0400] 感染性真菌的例子包括但不限于:新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、夹膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*)。考虑了本文所述的ActRII拮抗剂和方法用于治疗这些真菌剂的感染。因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了任选地与一种或多种支持疗法和/或活性剂组合地使用一种或多种ActRII拮抗剂治疗或预防真菌感染的方法,所述真菌感染包括例如曲霉菌病、鹅口疮、隐球菌病、芽生菌病、球孢子菌病和组织胞浆菌病。

[0401] 感染性寄生虫的例子包括但不限于:溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、结肠肠袋虫 (*Balantidium coli*)、福氏耐格里阿米巴 (*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴属物种 (*Acanthamoeba sp.*)、蓝氏贾第虫 (*Giardia lamblia*)、隐孢子虫属物种 (*Cryptosporidium sp.*)、卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、果氏巴贝虫 (*Babesia microti*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*)、鼠弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、巴西日圆线虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*)。考虑了本文所述的ActRII拮抗剂和方法用于治疗这些寄生虫的感染。因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了任选地与一种或多种支持疗法和/或活性剂组合地使用一种或多种ActRII拮抗剂治疗或预防真菌感染的方法,所述真菌感染包括例如非洲锥虫病、阿米巴病、蛔虫病、巴贝虫病、查加斯病、华支睾吸虫病、隐孢子虫病、囊虫病、裂头绦虫病、龙线虫病、包虫病、蛲虫病、片形吸虫病、姜片虫病、丝虫病、自由生活阿米巴虫感染、贾第虫病、颚口线虫病、膜壳绦虫病、等孢子球虫病、黑热病、利什曼病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、蛲虫感染、疥疮、血吸虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形虫病、旋毛虫病 (*Trichinellosis*)、旋毛虫病 (*Trichinosis*)、鞭虫病和锥虫病。

[0402] 在一些实施方案中,本公开文本提供了治疗感染性疾病的方法,其通过向有需要的患者给予有效量的单独的或与用于治疗病原体的第二治疗剂组合的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂,所述第二治疗剂是例如抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂或抗寄生虫药。

[0403] 通常,抗生素是指抑制细菌生长或杀死细菌的任何化合物。抗生素的有用的非限

制性例子包括林可酰胺类(克林霉素(clindomycin))；氯霉素；四环素类(如四环素、金霉素、地美环素、美他环素、多西环素、米诺环素)；氨基糖苷类(如庆大霉素、妥布霉素、奈替米星、阿米卡星、卡那霉素、链霉素、新霉素)； $\beta$ -内酰胺类(如青霉素、头孢菌素、亚胺培南、氨曲南)；万古霉素；杆菌肽；大环内酯类(红霉素)、两性霉素；磺酰胺类(如磺胺、磺胺甲噁唑、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺西汀、磺胺多辛、磺胺米隆、对氨基苯甲酸、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑)；乌洛托品；呋喃妥因；非那吡啶；甲氧苄啶；利福平；甲硝唑；头孢唑林；林可霉素；大观霉素；莫匹罗星；喹诺酮类(如萘啶酸、西诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、甲氟哌酸、氧氟沙星、依诺沙星、氟罗沙星、左氧氟沙星)；新生霉素；多粘菌素；短杆菌肽；和抗假单胞菌类(antipseudomonal)(如羧苄西林、卡茚西林、替卡西林、阿洛西林、美洛西林、哌拉西林)或其任何盐或变体。还参见Physician's Desk Reference, 第59增版, (2005), Thomson P D R, 新泽西州蒙特维尔; Gennaro等人编辑Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 第20增版, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, 马里兰州巴尔的摩; Braunwald等人编辑Harrison's Principles of Internal Medicine, 第15版, (2001), 纽约州麦格劳希尔; Berkow等人编辑The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, 新泽西州拉威。所用抗生素将取决于细菌感染的类型。

[0404] 通常,抗真菌剂是指抑制真菌生长或杀死真菌的任何化合物。非限制性例子包括咪唑类(如灰黄霉素、咪康唑、特比萘芬、氟康唑、酮康唑、伏立康唑和伊曲康唑)；多烯类(如两性霉素B和制霉菌素)；氟胞嘧啶；和杀念菌素或其任何盐或变体。还参见Physician's Desk Reference, 第59增版, (2005), Thomson P D R, 新泽西州蒙特维尔; Gennaro等人编辑Remington's The Science and Practice of Pharmacy第20增版, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, 马里兰州巴尔的摩; Braunwald等人编辑Harrison's Principles of Internal Medicine, 第15增版, (2001), 纽约州麦格劳希尔; Berkow等人编辑The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, 新泽西州拉威。所用抗真菌剂将取决于真菌感染的类型。

[0405] 抗病毒药是指抑制病毒作用的任何化合物。非限制性例子包括干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\gamma$ 、去羟肌苷、拉米夫定、扎那米韦、洛匹那韦(lopanivir)、奈非那韦、依法韦伦、茚地那韦、伐昔洛韦、齐多夫定、金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林、更昔洛韦、膦甲酸和阿昔洛韦或其任何盐或变体。还参见Physician's Desk Reference, 第59增版, (2005), Thomson P D R, 新泽西州蒙特维尔; Gennaro等人编辑Remington's The Science and Practice of Pharmacy第20增版, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, 马里兰州巴尔的摩; Braunwald等人编辑Harrison's Principles of Internal Medicine, 第15增版, (2001), 纽约州麦格劳希尔; Berkow等人编辑The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, 新泽西州拉威。所用抗病毒药将取决于病毒感染的类型。

[0406] 抗寄生虫剂是指抑制寄生虫生长或杀死寄生虫的任何化合物。抗寄生虫剂的有用的非限制性例子包括氯喹、甲氟喹、奎宁、伯氨喹、阿托伐醌、磺胺多辛和乙嘧啶或其任何盐或变体。还参见Physician's Desk Reference, 第59增版, (2005), Thomson P D R, 新泽西州蒙特维尔; Gennaro等人编辑Remington's The Science and Practice of Pharmacy第20增版, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, 马里兰州巴尔的摩; Braunwald等人

编辑Harrison's Principles of Internal Medicine,第15增版, (2001),纽约州麦格劳希尔; Berkow等人编辑The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories,新泽西州拉威。所用抗寄生虫剂将取决于寄生虫感染的类型。

[0407] 与上文所讨论的其对肿瘤的应用类似,本文所述的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂可以单独地或作为佐剂与疫苗组合地用于刺激针对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。这些方法可以与其他形式的免疫疗法(如细胞因子治疗)(例如,给予干扰素、GM-CSF、G-CSF或IL-2)组合。这种治疗方法可能特别有用的病原体的例子包括目前没有有效疫苗的病原体或常规疫苗不完全有效的病原体。这些病原体包括但不限于HIV、肝炎(甲型、乙型和丙型)、流感、疱疹、贾第虫属(Giardia)、疟疾、利什曼原虫属(Leishmania)、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌(Pseudomonas Aeruginosa)。

[0408] 在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有乳腺癌的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有多发性骨髓瘤的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有乳腺癌的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有骨髓增生异常综合征的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有分泌FSH的垂体瘤的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有前列腺癌的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予与正常健康患者相比具有不希望地升高的免疫活性(例如,提高的T细胞活性)的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有自身免疫障碍或自身免疫相关障碍的患者。在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有通过不希望地升高的T细胞活性介导的自身免疫障碍或自身免疫相关障碍的患者。例如,在一些实施方案中,不将本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂给予患有以下中的一种或多种的患者:急性播散性脑脊髓炎、急性坏死性出血性白质脑炎、艾迪生病、丙种球蛋白缺乏症、斑秃、淀粉样变性、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合征(APS)、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性自主神经机能异常、自身免疫性肝炎、自身免疫性高脂血症、自身免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳病、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、自身免疫性甲状腺病、自身免疫性荨麻疹性、轴突性和神经元性神经病、巴洛病、白塞病、大疱性类天疱疮、卡斯特莱曼病、乳糜泻、查加斯病、慢性炎性脱髓鞘多发性神经病、慢性复发性多病灶性骨髓炎、变应性肉芽肿血管炎(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮/良性粘膜类天疱疮、克罗恩病、柯刚综合征(Cogans syndrome)、冷凝集素病、柯萨奇病毒性心肌炎、CREST病、原发性混合性冷球蛋白血症、脱髓鞘性神经病、疱疹样皮炎、皮肌炎、德维克病(Devic's disease)(视神经脊髓炎)、盘状狼疮、德雷尔斯勒综合征、子宫内膜异位症、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性筋膜炎、结节性红斑、实验性变应性脑脊髓炎、伊文思综合征(Evans syndrome)、纤维化肺泡炎、巨细胞性动脉炎、巨细胞性心肌炎、肾小球肾炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏脑炎(Hashimoto's encephalitis)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、妊娠期疱疹、低丙球蛋白血症、IgA肾病、IgG4相关硬化性疾病、免疫

调控性脂蛋白、包涵体肌炎、间质性膀胱炎、幼年型关节炎、幼年型肌炎、川崎综合征、兰伯特-伊顿综合征、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木样结膜炎、线性 IgA 病 (LAD)、狼疮 (SLE)、莱姆病 (慢性)、梅尼埃病、显微镜下多血管炎、混合性结缔组织病 (MCTD)、蚕蚀性角膜溃疡 (Mooren's ulcer)、穆-哈病 (Mucha-Habermann disease)、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、视神经脊髓炎 (德维克病)、眼部瘢痕性类天疱疮、视神经炎、复发性风湿病、PANDAS (儿童链球菌感染相关性自身免疫性神经精神障碍)、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、帕-罗二氏综合征 (Parry-Romberg syndrome)、帕森纳-特纳综合征 (Parsonage-Turner syndrome)、睫状体扁平部炎 (周边葡萄膜炎)、天疱疮、静脉周围脑脊髓炎、POEMS 综合征、结节性多动脉炎、I型、II型和 III型自身免疫性多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、孕酮性皮炎、原发性胆汁性肝硬变、原发性硬化性胆管炎、银屑病、银屑病性关节炎、坏疽性脓皮病、雷诺现象、反应性关节炎、反射性交感神经营养障碍、莱特综合征、复发性多软骨炎、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、施密特综合征、巩膜炎、硬皮病、舍格伦综合征、精子及睾丸自身免疫、僵人综合征、苏萨克综合征 (Susac's syndrome)、交感性眼炎、大动脉炎 (Takayasu's arteritis)、痛性眼肌麻痹综合征 (Tolosa-Hunt syndrome)、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化型结缔组织病 (UCTD)、水疱性皮肤病、韦格纳肉芽肿病。在一些实施方案中，不将本公开文本的 ActRII 和/或 TGF $\beta$  拮抗剂给予正在经历组织或器官移植的患者。在一些实施方案中，不将本公开文本的 ActRII 和/或 TGF $\beta$  拮抗剂给予已经进行组织或器官移植的患者。在一些实施方案中，不将本公开文本的 ActRII 和/或 TGF $\beta$  拮抗剂给予患有移植植物抗宿主病的患者。在一些实施方案中，不将本公开文本的 ActRII 和/或 TGF $\beta$  拮抗剂给予正在用一种或多种免疫抑制剂和/或免疫抑制疗法治疗的患者。

[0409] 在某些实施方案中，本公开文本提供了通过测量患者的一个或多个血液学参数管理患者的方法，所述患者已经用本公开文本的一种或多种 ActRII 拮抗剂治疗，或者是要用本公开文本的一种或多种 ActRII 拮抗剂治疗的候选者。血液学参数可以用于评价作为要用本公开文本的拮抗剂治疗的候选者的患者的适当给药，以监测治疗期间的血液学参数，以评价在用本公开文本的一种或多种拮抗剂治疗期间是否调整剂量和/或评价本公开文本的一种或多种拮抗剂的适当维持剂量。如果一个或多个血液学参数在正常水平以外，则可以减少、延迟或终止使用一种或多种 ActRII 拮抗剂的给药。

[0410] 可以根据本文所提供的方法测量的血液学参数包括例如红细胞水平、血压、铁储备和使用本领域公认的方法在体液中发现的与增加的红细胞水平相关的其他因素。可以使用来自患者的血液样品来确定此类参数。红细胞水平、血红蛋白水平和/或血细胞比容水平的增加可能导致血压升高。

[0411] 在一个实施方案中，如果在作为要用一种或多种 ActRII 拮抗剂治疗的候选者的患者体内，一个或多个血液学参数在正常范围以外或者在正常范围的高侧，则可以延迟所述一种或多种拮抗剂的给予的开始，直到血液学参数已经自然地或通过治疗干预恢复到正常或可接受的水平为止。例如，如果候选患者是高血压或高血压前期，则可以用降血压剂治疗患者以降低患者的血压。可以使用适合于单独患者的状况的任何降血压剂，包括例如利尿药、肾上腺素能抑制剂 (包括  $\alpha$  阻断剂和  $\beta$  阻断剂)、血管扩张剂、钙通道阻断剂、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂或血管紧张素 II 受体阻断剂。可替代地，可以使用饮食和锻炼方案来治

疗血压。类似地,如果候选患者的铁储备低于正常范围或在正常范围的低侧,则患者可以用适当的饮食和/或铁补充剂方案治疗,直到患者的铁储备恢复至正常或可接受的水平为止。对于具有高于正常的红细胞水平和/或血红蛋白水平的患者,则可以延迟本公开文本的一种或多种拮抗剂的给予,直到所述水平已经恢复至正常或可接受的水平为止。

[0412] 在某些实施方案中,如果在作为要用一种或多种ActRII拮抗剂药剂治疗的候选者的患者体内,一个或多个血液学参数在正常范围以外或者在正常范围的高侧,则可以不延迟给予的开始。然而,可以将所述一种或多种拮抗剂的给药的剂量或频率设定为降低在给予本公开文本的所述一种或多种拮抗剂时出现的血液学参数的不可接受的增加的风险的量。可替代地,可以为患者研发治疗方案,所述治疗方案将一种或多种ActRII拮抗剂与解决不需要的血液学参数的水平的治疗剂组合。例如,如果患者的血压升高,则治疗方案可以设计为包括给予一种或多种ActRII拮抗剂和降血压剂。对于具有低于所需的铁储备的患者,治疗方案可以研发为包括一种或多种ActRII拮抗剂和铁补充。

[0413] 在一个实施方案中,可以为作为要用一种或多种ActRII拮抗剂治疗的候选者的患者确立一个或多个血液学参数的一个或多个基线参数,并且可以基于所述一个或多个基线值为所述患者确立适当的给药方案。可替代地,基于患者的病史确立的基线参数可以用于报告患者的适当拮抗剂给药方案。例如,如果健康患者的确立的基线血压读数高于限定的正常范围,则可能不必将患者的血压纳入一般群体在用本公开文本的所述一种或多种拮抗剂治疗之前被认为正常的范围内。患者的一个或多个血液学参数在用一种或多种ActRII拮抗剂治疗之前的基线值还可以作为相关比较值,用于监测血液学参数在用本文所述的所述一种或多种拮抗剂治疗期间的任何变化。

[0414] 在某些实施方案中,在正在用一种或多种ActRII拮抗剂治疗的患者体内测量一个或多个血液学参数。血液学参数可以用于在治疗期间监测患者,并且允许调节或终止使用本公开文本的所述一种或多种拮抗剂的给药或使用另一种治疗剂的另外的给药。例如,如果给予一种或多种ActRII拮抗剂导致血压、红细胞水平或血红蛋白水平的升高或者铁储备的减少,则可以降低本公开文本的所述一种或多种拮抗剂的剂量的量或频率,以降低本公开文本的所述一种或多种拮抗剂对所述一个或多个血液学参数的影响。如果给予一种或多种ActRII拮抗剂导致一个或多个血液学参数的对患者不利的变化,则可以暂时终止本文所述的所述一种或多种拮抗剂的给药,直到所述一个或多个血液学参数恢复到可接受的水平为止,或永久终止给药。类似地,如果在降低本文所述的所述一种或多种拮抗剂的给予的剂量或频率后,没有使一个或多个血液学参数恢复到可接受的范围内,则可以终止给药。作为减少或终止使用本文所述的所述一种或多种拮抗剂的给药的替代方案或除其以外,可以用解决不需要的所述一个或多个血液学参数的水平的另一种治疗剂对患者进行给药,所述另一种治疗剂是例如降血压剂或铁补充剂。例如,如果正在用一种或多种ActRII拮抗剂治疗的患者的血压升高,则使用本公开文本的所述一种或多种拮抗剂的给药能以相同水平继续进行,并且将降血压剂添加至治疗方案;将使用所述一种或多种拮抗剂(例如,在量和/或频率方面)和降血压剂的给药添加至治疗方案;或者可以终止使用所述一种或多种拮抗剂的给药并且可以用降血压剂治疗患者。

[0415] 10. 药物组合物

[0416] 在某些方面中,本公开文本的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂或此类拮抗剂的组合可以

单独地或作为药物制剂(也称为治疗组合物或药物组合物)的组分来给予。药物制剂是指如下制剂,其呈使得其中所含活性成分(例如,本公开文本的药剂)的生物活性有效的形式,并且不含对给予制剂的受试者具有不可接受的毒性的其他组分。主题化合物可以配制用于以任何便利的方式给予以供在人或兽医医学中使用。例如,本公开文本的一种或多种药剂可以与药学上可接受的载体一起配制。药学上可接受的载体是指药物制剂中除活性成分之外的成分,其通常对受试者无毒。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂和/防腐剂。通常,当给予受试者时,用于本公开文本的药物制剂呈无热原的生理学上可接受的形式。可以任选地包括在如上所述制剂中的除了本文所述那些之外的治疗上有用的药剂可以在本公开文本的方法中与主题药剂组合给予。

[0417] 在某些实施方案中,组合物将肠胃外地[例如,通过静脉内(I.V.)注射、动脉内注射、骨内注射、肌内注射、鞘内注射、皮下注射或皮内注射]给予。适用于肠胃外给予的药物组合物可以包含本公开文本的一种或多种药剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液或可以刚好在使用之前重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末的组合。可注射溶液或分散液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂或使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质。可以用于本公开文本的药物制剂中的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、植物油(例如,橄榄油)、可注射有机酯(例如,油酸乙酯)及其合适的混合物。例如,通过使用包衣材料(例如,卵磷脂),在分散液的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。

[0418] 在一些实施方案中,将化合物给予眼,包括例如通过局部给予、眼内(例如,玻璃体内)注射或通过植入体或装置来给予。玻璃体内注射可以例如经睫状体扁平部在边缘后3mm至4mm处注射。用于给予眼的药物组合物能以多种方式来配制,包括例如滴眼剂、眼用溶液、眼用悬液、眼用乳液、玻璃体内注射液、筋膜囊下注射液、眼用生物降解性植入体和非生物降解性眼用插入物或储库。

[0419] 在一些实施方案中,本公开文本的治疗方法包括从植入物或装置全身地或局部地给予药物组合物。此外,药物组合物能以用于递送至目标组织部位(例如,骨髓或肌肉)的形式包封或注射。在某些实施方案中,本公开文本的组合物可以包括能够将本公开文本的一种或多种药剂递送至目标组织部位(例如,骨髓或肌肉)的基质,从而提供用于发育中组织并且最佳地能够被吸收至体内的结构。例如,基质可以提供本公开文本的一种或多种药剂的缓慢释放。此类基质可以由目前用于其他植入医学应用的材料形成。

[0420] 基质材料的选择可以基于以下中的一种或多种:生物相容性、生物降解性、机械特性、美容外观和界面特性。主题组合物的特定应用将定义适当的制剂。组合物的潜在基质可以是可生物降解的且化学成分确定的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸和聚碳酸。其他潜在的材料是可生物降解的且生物学成分明确确定的,包括例如骨或真皮胶原。其他基质包括纯蛋白质或细胞外基质组分。其他潜在的基质是不可生物降解的且化学成分确定的,包括例如烧结的羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其他陶瓷。基质可以包括任何上述类型的材料的组合,包括例如聚乳酸和羟基磷灰石或胶原和磷酸三钙。可以改变生物陶瓷的组成(例如,钙-铝酸盐-磷酸盐)和加工以改变孔径、粒度、粒子形状和生物降解性中的一种或多种。

[0421] 在某些实施方案中，本公开文本的药物组合物可以局部地给予。“局部施用”或“局部地”意指药物组合物与体表(包括例如皮肤、伤口部位和粘膜)接触。局部药物组合物可以具有多种施用形式，并且通常包含含药物层，其适合于在局部给予该组合物时放置在组织附近或与组织直接接触。适合于局部给予的药物组合物可以包含本公开文本的一种或多种ActRIIB和/或TGF $\beta$ 拮抗剂，将其组合配制为液体、凝胶、乳膏、洗剂、软膏、泡沫、糊剂、油灰(putty)、半固体或固体。呈液体、凝胶、乳膏、洗剂、软膏、泡沫、糊剂或油灰形式的组合物可以通过在目标组织上摊开、喷涂、涂抹、轻擦或滚动组合物来施用。组合物还可以浸渍至无菌敷料、透皮贴剂、膏药和绷带中。油灰、半固体或固体形式的组合物可以是可变形的。它们可以是弹性的或非弹性的(例如，柔性或刚性的)。在某些方面中，组合物形成复合材料的一部分并且可以包括纤维、微粒或具有相同或不同组成的多个层。

[0422] 呈液体形式的局部组合物可以包括药学上可接受的溶液、乳液、微乳液和悬浮液。除了所述一种或多种活性成分之外，液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂，包括例如水或其他溶剂、增溶剂和/或乳化剂[例如，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇或1,3-丁二醇、油(例如，棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇、脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物]。

[0423] 局部凝胶、乳膏、洗剂、软膏、半固体或固体组合物可以包括一种或多种增稠剂，如多糖、合成聚合物或基于蛋白质的聚合物。在本发明的一个实施方案中，本文的胶凝剂是合适地无毒并且提供所需粘度的胶凝剂。增稠剂可以包括以下的聚合物、共聚物和单体：乙烯吡咯烷酮、甲基丙烯酰胺、丙烯酰胺N-乙烯基咪唑、羧基乙烯基、乙烯基酯、乙烯基醚、聚硅酮、聚氧化乙烯、聚乙二醇、乙烯醇、丙烯酸钠、丙烯酸酯、马来酸、NN-二甲基丙烯酰胺、双丙酮丙烯酰胺、丙烯酰胺、丙烯酰基吗啉、普朗尼克、胶原、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯基撑、聚乙烯硅酸酯、用糖(例如，蔗糖、葡萄糖、葡糖胺、半乳糖、海藻糖、甘露糖或乳糖)取代的聚丙烯酸酯、酰基酰胺丙烷磺酸、四甲氧基正硅酸酯、甲基三甲氧基正硅酸酯、四烷氧基正硅酸酯、三烷氧基正硅酸酯、二醇、丙二醇、丙三醇、多糖、海藻酸酯、葡聚糖、环糊精、纤维素、改性纤维素、氧化纤维素、壳聚糖、几丁质、瓜尔胶、角叉菜胶、透明质酸、菊粉、淀粉、改性淀粉、琼脂糖、甲基纤维素、植物胶、透明质烷(hylaronan)、水凝胶、明胶、葡糖氨基葡聚糖、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、果胶、低甲氧基果胶、交联葡聚糖、淀粉-丙烯腈接枝共聚物、淀粉聚丙烯酸钠、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、聚乙烯基撑、聚乙烯基乙醚、聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯、聚氨酯、聚链烷酸酯、聚乳酸、聚乳酸酯、聚(3-羟基丁酸酯)、磺化水凝胶、AMPS(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、SEM(甲基丙烯酸磺乙酯)、SPM(甲基丙烯酸磺丙酯)、SPA(丙烯酸磺丙酯)、N,N-二甲基-N-甲基丙烯酸乙基-N-(3-磺丙基)铵甜菜碱、甲基丙烯酸酰胺基丙基-二甲基铵磺基甜菜碱、SPI(衣康酸-双(1-丙基磺酸-3)酯二钾盐)、衣康酸、AMBC(3-丙烯酰胺基-3-甲基丁酸)、 $\beta$ -羧乙基丙烯酸酯(丙烯酸二聚体)以及马来酸酐-甲基乙烯醚聚合物、其衍生物、其盐、其酸及其组合。在某些实施方案中，本公开文本的药物组合物可以口服地给予，例如以下列形式：胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质如蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉末、颗粒、在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液、水包油或油包水液体乳液或酏剂或糖浆或软锭剂(使用惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口水，每一种均含有预定量的本公开文本的化合物和任选地一种或多种其他活性成分。本公开文本的化合物和任选地一种或多种

其他活性成分也能以大丸药、药糖剂或糊剂给予。

[0424] 在用于口服给予的固体剂型(例如,胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末和颗粒)中,本公开文本的一种或多种化合物可以与一种或多种药学上可接受的载体混合,所述载体包括例如柠檬酸钠、磷酸二钙、填充剂或增量剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸)、粘合剂(例如,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、保湿剂(例如,甘油)、崩解剂(例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或树薯淀粉、海藻酸、硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如,石蜡)、吸收促进剂(例如,季铵化合物)、润湿剂(例如,鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)、吸收剂(例如,高岭土和膨润土)、润滑剂(例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)、着色剂及其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物制剂(组合物)还可以包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可以用作使用包括例如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇在内的一种或多种赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0425] 用于口服给予药物组合物的液体剂型可以包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了所述一种或多种活性成分之外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂,包括例如水或其他溶剂、增溶剂和/或乳化剂[例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇或1,3-丁二醇、油(例如,棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃、聚乙二醇、脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物]。除惰性稀释剂外,口服制剂还可以包括佐剂,包括例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂、防腐剂及其组合。

[0426] 除活性化合物外,悬浮液可以含有悬浮剂,包括例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇、脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂、黄蓍胶及其组合。

[0427] 通过包含多种抗细菌剂和抗真菌剂(包括例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇和苯酚山梨酸)可以确保防止微生物的作用和/或生长。

[0428] 在某些实施方案中,可能需要在组合物中包括等渗剂,包括例如糖或氯化钠。另外,通过包含延迟吸收的试剂(包括例如单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0429] 应理解,剂量方案将由主治医师通过考虑改变本公开文本的所述一种或多种药剂的作用的多种因素来确定。在促进红细胞形成的ActRII和/或TGF $\beta$ 拮抗剂的情况下,多种因素可以包括但不限于患者的红细胞计数、血红蛋白水平、所需的目标红细胞计数、患者年龄、患者性别、患者饮食、可能有助于降低的红细胞水平的任何疾病的严重程度、给予时间和其他临床因素。向最终组合物中添加其他已知的活性剂也可能影响剂量。可以通过定期评估红细胞水平、血红蛋白水平、网织红细胞水平和造血过程的其他指示物中的一种或多种来监测进展。

[0430] 在某些实施方案中,本公开文本还提供了用于体内产生本公开文本的一种或多种药剂的基因疗法。这种疗法将通过将药剂序列引入具有以上列出的一种或多种障碍的细胞或组织中来实现其治疗作用。例如,通过使用重组表达载体如嵌合病毒或胶体分散系统,可以实现药剂序列的递送。本公开文本的一种或多种药剂序列的优选治疗性递送是靶向脂质体的使用。

[0431] 如本文所教导的可以用于基因疗法的多种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、痘苗

或RNA病毒(例如,逆转录病毒)。逆转录病毒载体可以是鼠类或禽类逆转录病毒的衍生物。可以插入单个外源基因的逆转录病毒载体的例子包括但不限于:莫洛尼鼠白血病病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺瘤病毒(MuMTV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)。许多其他逆转录病毒载体可以掺入多种基因。所有这些载体都可以转移或掺入可选择的标记的基因,使得可以鉴定和产生经转导的细胞。逆转录病毒载体可以通过附着例如糖、糖脂或蛋白质而成靶标特异性的。优选的靶向通过使用抗体来完成。本领域技术人员应认识到,可以将特定多核苷酸序列插入逆转录病毒基因组中或附着于病毒包膜,以允许含有本公开文本的一种或多种药剂的逆转录病毒载体的靶标特异性递送。

[0432] 可替代地,可以通过常规磷酸钙转染,用编码逆转录病毒结构基因(gag、pol和env)的质粒直接转染组织培养细胞。然后用含有所关注基因的载体质粒转染这些细胞。所得细胞将逆转录病毒载体释放到培养基中。

[0433] 用于本公开文本的一种或多种药剂的另一种靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,其包括水包油乳液、胶团、混合胶团和脂质体。在某些实施方案中,本公开文本的优选胶体系统是脂质体。脂质体是人工膜囊泡,其在体外和体内可用作递送运载体。可以将RNA、DNA和完整病毒粒子包封于水性内部内,并以生物活性形式递送至细胞[Fraley等人(1981)Trends Biochem. Sci., 6:77]。使用脂质体运载体的有效基因转移方法是本领域已知的[Mannino等人(1988)Biotechniques, 6:682, 1988]。

[0434] 脂质体的组成通常是磷脂的组合,所述磷脂可以包括类固醇(例如胆固醇)。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。也可以使用其他磷脂或其他脂质,包括例如磷脂酰化合物(例如,磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂)、卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。基于例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性,脂质体的靶向也是可能的,并且是本领域已知的。

[0435] 实施例

[0436] 现在一般性地描述本发明,通过参考以下实施例将更容易地理解本发明,所述实施例仅用于说明本发明的某些实施方案和实施方案的目的而被包括在内,并不旨在限制本发明。

[0437] 实施例1:ActRIIa-Fc融合蛋白

[0438] 产生ActRIIA融合蛋白,其具有用之间的接头融合至人或小鼠Fc结构域的人ActRIIa的细胞外结构域。将构建体分别称为ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc。

[0439] ActRIIA-hFc在下文中显示为从CHO细胞系中纯化(SEQ ID NO:50):

[0440] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNISIGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT  
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPETCVVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDCGEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0441] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白是在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列:

[0442] (i) 蜜蜂蜂毒肽 (HBML) : MKFLVNVALVFMVYIISYIYA (SEQ ID NO:51)

[0443] (ii) 组织型纤溶酶原激活物 (TPA) : MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO:52)

[0444] (iii) 天然的: MGAAAKLAFAVFLISCSSGA (SEQ ID NO:53)。

[0445] 所选择的形式使用TPA前导序列并具有以下未经加工的氨基酸序列: MDAMKRLCC VLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:54)

[0446] 这种多肽是由以下核酸序列编码:

[0447] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCTCGTTGCCCGG CGCCGCTATACTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTAATGCTAATTGGAAAAAGACAGAACCAATC AAACTGGTGTGAACCGTGTATGGTACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTGCTACCTGGAAGAATATTCTGG TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGGTGTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTAGAAAAAA AAGACAGCCCTGAAGTATATTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGAATGAAAAGTTTCTTATTTCCGGAGAT GGAAGTCACACAGCCCACCTCAAATCCAGTTACACCTAACGCCACCCACCGGTGGAACTCACACATGCCACCG TGCCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCTCACCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAG TCCCCATCGAGAAAACCCTCCTGAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCTCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCC TCTATAGCAAGCTACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATGAGAATT (SEQ ID NO:55)

[0448] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc都非常适合于重组表达。如图5中所示,将蛋白质纯化为单个的界限清晰的蛋白质峰。N末端测序揭示了-ILGRSETQE的单个序列 (SEQ ID NO:56)。可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以任何顺序的以下步骤中的三步或更多步:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。将ActRIIA-hFc蛋白纯化至纯度>98% (如通过尺寸排阻色谱所测定的) 和>95% (如通过SDS PAGE所测定的)。

[0449] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc对配体显示出高亲和力。使用标准的胺偶联程序将GDF-11或激活素A固定化于Biacore<sup>TM</sup>CM5芯片上。将ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白加载至系统上,并且测量结合。ActRIIA-hFc以 $5 \times 10^{-12}$ 的解离常数 ( $K_D$ ) 结合至激活素并以 $9.96 \times 10^{-9}$ 的 $K_D$ 结合至GDF11。参见图6。ActRIIA-mFc的行为类似。

[0450] ActRIIA-hFc在药代动力学研究中极为稳定。用1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg的ActRIIA-hFc蛋白对大鼠给药,并在24、48、72、144和168小时测量蛋白质的血浆水平。在单独研究中,以1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg对大鼠给药。在大鼠体内,ActRIIA-hFc具有11-14天的血清半衰期,并且在两周后药物的循环水平极高(对于1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的初

始给予,分别为11 $\mu$ g/ml、110 $\mu$ g/ml或304 $\mu$ g/ml)。在食蟹猴体内,血浆半衰期显著大于14天,并且对于1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的初始给予,药物的循环水平分别为25 $\mu$ g/ml、304 $\mu$ g/ml或1440 $\mu$ g/ml。

[0451] 可以根据本文所述的方法使用的多种ActRIIA变体描述于通过引用以其整体并入本文的作为WO 2006/012627公开的国际专利申请中(参见例如,第55–58页)。替代构建体可以具有C末端尾部(ActRIIA的细胞外结构域的最后15个氨基酸)的缺失。这种构建体的序列呈现于下文中(Fc部分加下划线)(SEQ ID NO:57) :

[0452] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT  
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIASKAKG  
QPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0453] 实施例2:ActRIIB-Fc融合蛋白的产生

[0454] 构建可溶ActRIIB融合蛋白,其具有用之间的接头融合至人或小鼠Fc结构域的人ActRIIB的细胞外结构域。将构建体分别称为ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc。

[0455] ActRIIB-hFc在下文中显示为从CHO细胞系中纯化(SEQ ID NO:58):GRGEAETRECI  
YY NANWE LERTN QSGLER CE GEQDKRLHCYAS WRN SSGTIELV KKGCWL DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGN  
FCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIASKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0456] ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc蛋白是在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列:(i)蜜蜂蜂毒肽(HBML)、(ii)组织型纤溶酶原激活物(TPA)和(iii)天然的:MGAAAKLAFAVFLISCSSGA(SEQ ID NO:59)。

[0457] 所选择的形式使用TPA前导序列并具有以下未经加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:60):

[0458] MDAMKRG LCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECI YY NANWE LERTN QSGLER CE GEQDKRLHCYASW  
RN SSGTIELV KKGCWL DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTAPTGGGTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIASKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0459] 这种多肽是由以下核酸序列(SEQ ID NO:61)编码:

[0460]

A	TGGATGCAAT	GAAGAGAGGG	CTCTGCTGTG	TGCTGCTGCT
GTGTGGAGCA	GTCTTCGTTT	CGCCCGGCCGC	CTCTGGCGT	
GGGGAGGCTG	AGACACGGGA	GTGCATCTAC	TACAACGCCA	
ACTGGGAGCT	GGAGCGCACC	AACCAGAGCG	GCCTGGAGCG	
CTGCGAAGGC	GAGCAGGACA	AGCGGCTGCA	CTGCTACGCC	
TCCTGGCGCA	ACAGCTCTGG	CACCATCGAG	CTCGTGAAGA	
AGGGCTGCTG	GCTAGATGAC	TTCAACTGCT	ACGATAGGCA	
GGAGTGTGTG	GCCACTGAGG	AGAACCCCCA	GGTGTACTTC	
TGCTGCTGTG	AAGGCAACTT	CTGCAACGAG	CGCTTCACTC	
ATTTGCCAGA	GGCTGGGGC	CCGGAAGTCA	CGTACGAGCC	
ACCCCCGACA	GCCCCCACCG	GTGGTGGAAC	TCACACATGC	
CCACCGTGCC	CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG	
TCTTCCTCTT	CCCCCCAAAA	CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	
CTCCC GGACC	CCTGAGGTCA	CATGCGTGGT	GGTGGACGTG	
AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTTCAAC	TGGTACGTGG	
ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA	
GGAGCAGTAC	AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	
ACCGTCCTGC	ACCAGGACTG	GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	
AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA	GCCCTCCCAG	TCCCCATCGA	
GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC	CCGAGAACCA	
CAGGTGTACA	CCCTGCC CCCC	ATCCC GGGAG	GAGATGACCA	
AGAACCCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	
TCCCAGCGAC	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	
CCGGAGAACCA	ACTACAAGAC	CACGCCTCCC	GTGCTGGACT	
CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TATAGCAAGC	TCACCGTGGA	
CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC	
GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAACGA	
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA				

[0461] CHO细胞产生的材料的N末端测序揭示了-GRGEAE的主要序列 (SEQ ID NO:62)。值得注意的是,文献中报告的其他构建体以-SGR…序列开始。

[0462] 可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以任何顺序的以下步骤中的三步或更多步:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0463] 在ActRIIB的细胞外结构域中产生一系列突变,并且这些突变体蛋白是作为细胞外ActRIIB与Fc结构域之间的可溶融合蛋白而产生的。背景ActRIIB-Fc融合物具有SEQ ID NO:58的序列。

[0464] 将多种突变(包括N末端和C末端截短)引入背景ActRIIB-Fc蛋白中。基于本文所呈现的数据,预期如果与TPA前导序列一起表达,则这些构建体将缺少N末端丝氨酸。在ActRIIB细胞外结构域中通过PCR诱变产生突变。在PCR后,将片段通过Qiagen柱纯化,用SfI和AgeI消化并进行凝胶纯化。将这些片段连接至表达载体pAI4D(参见WO 2006/012627)中,使得在连接后它产生与人IgG1的融合嵌合体。在转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中后,挑取菌落并分离DNA。对于鼠构建体(mFc),用鼠IgG2a取代人IgG1。验证了所有突变体的序列。

[0465] 所有突变体都是在HEK293T细胞中通过瞬时转染产生的。总而言之,在500mL旋转器中,将HEK293T细胞以 $6 \times 10^5$ 个细胞/mL设置于250mL体积的Freestyle (Invitrogen) 培养基中并生长过夜。第二天,用DNA:PEI (1:1) 复合物以0.5ug/mL最终DNA浓度处理这些细胞。在4小时后,添加250mL培养基并使细胞生长7天。通过旋转沉降细胞来收获条件培养基并浓缩。

[0466] 使用多种技术(包括例如蛋白质A柱)纯化突变体,并用低pH(3.0)甘氨酸缓冲液洗脱。在中和后,将这些突变体用PBS透析。

[0467] 也在CHO细胞中通过类似方法产生突变体。在通过引用并入本文的WO2008/097541和WO 2006/012627中所述的结合测定和/或生物测定中测试突变体。在一些情况下,用条件培养基而不是纯化的蛋白质进行测定。ActRIIB的其他变异描述于美国专利号7,842,663中。

[0468] 包含具有N末端和C末端截短的人ActRIIB细胞外结构域(天然蛋白SEQ ID NO:1的残基25-131)的ActRIIB (25-131)-hFc融合蛋白与取代天然ActRIIB前导序列的TPA前导序列N末端融合并且通过最小接头(三个甘氨酸的残基)与人Fc结构域C末端融合(图7;SEQ ID NO:123)。编码这种融合蛋白的核苷酸序列显示于图8中(SEQ ID NO:124是编码链,并且SEQ ID NO:125是互补链)。修饰密码子并且发现编码ActRIIB (25-131)-hFc蛋白的变体核酸提供初始转化体的表达水平的显著改善(图9;SEQ ID NO:126是编码链并且SEQ ID NO:127是互补链)。

[0469] 成熟蛋白质具有如下氨基酸序列(通过N末端测序确认N末端)(SEQ ID NO:63):

[0470] ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVKKGWLDDFNC  
YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEVTYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL  
FPPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS  
LSPGK

[0471] 氨基酸1-107衍生自ActRIIB。

[0472] 使用一系列柱色谱步骤纯化所表达的分子,包括例如以任何顺序的以下步骤中的

三步或更多步：蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0473] 在体外用Biacore<sup>TM</sup>仪器评价若干种配体对ActRIIB(25-131)-hFc及其全长对应物ActRIIB(20-134)-hFc的亲和力，并且将结果归纳于下表中。由于复合物极快地缔合与解离妨碍了k<sub>on</sub>和k<sub>off</sub>的准确测定，Kd值是通过稳态亲和力拟合来获得的。ActRIIB(25-131)-hFc以高亲和力结合激活素A、激活素B和GDF11。

[0474] ActRIIB-hFc形式的配体亲和力：

[0475]	融合构建体	激活素A ( e-11 )	激活素B ( e-11 )	GDF11 ( e-11 )
	ActRIIB(20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
	ActRIIB(25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1

[0476] 实施例3：GDF阱的产生

[0477] 如下构建GDF阱。具有ActRIIB的经修饰细胞外结构域(具有L79D取代的SEQ ID NO:1的氨基酸20-134)的多肽相对于GDF11和/或肌生成抑制蛋白具有显著降低的激活素A结合(由于SEQ ID NO:1中位置79处亮氨酸至天冬氨酸的取代)，所述多肽用之间的最小接头(三个甘氨酸氨基酸)与人或小鼠Fc结构域融合。将构建体分别称为ActRIIB(L79D 20-134)-hFc和ActRIIB(L79D 20-134)-mFc。在位置79处具有谷氨酸而不是天冬氨酸的替代形式的表现类似(L79E)。还产生了下文的关于SEQ ID NO:64在位置226处具有丙氨酸而不是缬氨酸的替代形式，并且其在所测试的所有方面都有同等表现。位置79(相对于SEQ ID NO:1，或相对于SEQ ID NO:64的位置60)处的天冬氨酸在下文中是通过加双下划线来指示。在相对于SEQ ID NO:64的位置226处的缬氨酸也是在下文中通过加双下划线来指示。

[0478] GDF阱ActRIIB(L79D 20-134)-hFc在下文中显示为从CHO细胞系中纯化(SEQ ID NO:64)。

[0479]

GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWD~~DDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISR~~TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN~~AKTPREEQYNSTYR~~VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTI~~S~~KAKGQP~~REPQVYTL~~PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYK~~TPP~~VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0480] GDF阱中ActRIIB衍生的部分具有下文所述的氨基酸序列(SEQ ID NO:65)，并且该部分可以用作单体或用作呈单体、二聚体或更高阶复合物的非Fc融合蛋白。

[0481] GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWD~~DDDFNCYDR~~

QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO:65)

[0482] GDF阱蛋白是在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列：

[0483] (i) 蜜蜂蜂毒肽 (HBML)、(ii) 组织型纤溶酶原激活物 (TPA) 和 (iii) 天然的。

[0484] 所选择的形式使用TPA前导序列并具有以下未经加工的氨基酸序列：

[0485] MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYAS  
WRNSSGTIELVKKGWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK (SEQ ID NO:66)

[0486] 这种多肽是由以下核酸序列 (SEQ ID NO:67) 编码：

[0487]

A	TGGATGCAAT	GAAGAGAGGG	CTCTGCTGTG	TGCTGCTGCT
GTGTGGAGCA	GTCTTCGTTT	CGCCCGGCCGC	CTCTGGCGT	
GGGGAGGGCTG	AGACACGGGA	GTGCATCTAC	TACAACGCCA	
ACTGGGAGCT	GGAGCGCACC	AACCAGAGCG	GCCTGGAGCG	
CTGCGAAGGC	GAGCAGGACA	AGCGGCTGCA	CTGCTACGCC	
TCCTGGCGCA	ACAGCTCTGG	CACCATCGAG	CTCGTGAAGA	
AGGGCTGCTG	GGACGATGAC	TTCAACTGCT	ACGATAGGCA	
GGAGTGTGTG	GCCACTGAGG	AGAACCCCCA	GGTGTACTTC	
TGCTGCTGTG	AAGGCAACTT	CTGCAACGAG	CGCTTCACTC	
ATTTGCCAGA	GGCTGGGGGC	CCGGAAGTCA	CGTACGAGCC	
ACCCCCGACA	GCCCCCACCG	GTGGTGGAAC	TCACACATGC	
CCACCGTGCC	CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG	
TCTTCCTCTT	CCCCCCAAAAA	CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	
CTCCC GGACC	CCTGAGGTCA	CATGCGTGGT	GGTGGACGTG	
AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTTCAAC	TGGTACGTGG	
ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA	
GGAGCAGTAC	AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	
ACCGTCCTGC	ACCAGGACTG	GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	
AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA	GCCCTCCCAG	TCCCCATCGA	
GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC	CCGAGAACCA	
CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC	ATCCC GGGAG	GAGATGACCA	
AGAACCCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	
TCCCAGCGAC	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	
CCGGAGAACCA	ACTACAAGAC	CACGCCTCCC	GTGCTGGACT	
CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TATAGCAAGC	TCACCGTGGA	
CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC	
GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAACGA	

[0488]

GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0489] 可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以任何顺序的以下步骤中的三步

或更多步:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。在纯化方案的例子中,使细胞培养基经过蛋白质A柱,在150mM Tris/NaCl (pH8.0) 中洗涤,然后在50mM Tris/NaCl (pH 8.0) 中洗涤,并用0.1M甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱。将低pH洗脱物在室温下保持30分钟作为病毒清除步骤。然后中和洗脱物并使其经过Q琼脂糖离子交换柱并在50mM Tris (pH 8.0) 、50mM NaCl中洗涤,并在50mM Tris (pH 8.0) 中洗脱,其中NaCl浓度介于150mM与300mM之间。然后将洗脱物交换至50mM Tris (pH 8.0) 、1.1M硫酸铵中,并使其经过苯基琼脂糖柱,洗涤,并在50mM Tris (pH 8.0) 中洗脱,其中硫酸铵介于150与300mM之间。对洗脱物进行透析和过滤以供使用。

[0490] 其他GDF阱(经修饰以降低激活素A结合相对于肌生成抑制蛋白或GDF11结合的比率的ActRIIB-Fc融合蛋白)描述于通过引用并入本文的WO2008/097541和WO 2006/012627中。

[0491] 实施例4:GDF-11介导的信号传导和激活素介导的信号传导的生物测定

[0492] 使用A-204报告基因测定评价ActRIIB-Fc蛋白和GDF阱对GDF-11和激活素A的信号传导的影响。细胞系:人横纹肌肉瘤(衍生自肌肉)。报告载体:pGL3 (CAGA) 12(描述于Dennler等人,1998,EMBO 17:3091-3100中)。CAGA12基序存在于TGF $\beta$ 反应性基因(例如,PAI-1基因)中,因此这种载体通常用于通过SMAD2和SMAD3进行的因子信号传导。

[0493] 第1天:将A-204细胞分离至48孔板中。

[0494] 第2天:用10ug pGL3 (CAGA) 12或pGL3 (CAGA) 12 (10ug) +pRLCMV (1 $\mu$ g) 和Fugene转染A-204细胞。

[0495] 第3天:添加因子(稀释至培养基中+0.1% BSA)。在添加至细胞之前,抑制剂需要与因子一起预孵育1小时。6小时后,用PBS冲洗细胞并裂解。

[0496] 这之后进行荧光素酶测定。在不存在任何抑制剂下,激活素A显示报告基因表达的10倍刺激和约2ng/ml的ED50。GDF-11:16倍刺激,ED50:约1.5ng/ml。

[0497] 在如上所述的基于细胞的测定中测试ActRIIB-Fc蛋白和GDF阱的活性。结果归纳于下表中。在不同的C末端截短构建体中测试一些变体。GDF阱(L79D和L79E变体)显示激活素A抑制基本丧失,同时保留几乎野生型的GDF-11抑制。

[0498] 可溶ActRIIB-Fc与GDF11和激活素A的结合:

[0499]

ActRIIB-Fc 变异	ActRIIB的部分（对 应于SEQ ID NO: 1 的氨基酸）	GDF11抑制活性	激活素抑制活性
R64	20-134	+++ (大约 $10^{-8}$ M K <sub>I</sub> )	+++ (大约 $10^{-8}$ M K <sub>I</sub> )
A64	20-134	+ (大约 $10^{-6}$ M K <sub>I</sub> )	+ (大约 $10^{-6}$ M K <sub>I</sub> )
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 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	+	+

[0500] +较差活性(约 $1 \times 10^{-6}$  K<sub>I</sub>)[0501] ++中等活性(约 $1 \times 10^{-7}$  K<sub>I</sub>)[0502] +++良好(野生型)活性(约 $1 \times 10^{-8}$  K<sub>I</sub>)

[0503] +++++超过野生型的活性

[0504] 实施例5:具有截短的ActRIIB细胞外结构域的GDF阱的产生

[0505] 称为ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的具有截短的ActRIIB细胞外结构域的GDF阱是通过TPA前导序列与含有亮氨酸至天冬氨酸的取代(在SEQ ID NO:1中的残基79处)的截短细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131)的N末端融合以及用接头(三个甘氨酸残基)的人Fc结构域的C末端融合来产生(图12,SEQ ID NO:131)。ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的细胞纯化形式的序列呈现于图13中(SEQ ID NO:132),并且不含前导序列、接头或Fc结构域的成熟细胞外结构域呈现于图14中(SEQ ID NO:133)。编码这种融合蛋白的一个核苷酸序列(SEQ ID NO:134)与其互补序列(SEQ ID NO:135)一起显示于图15中,并且编码确切地相同的融合蛋白的替代核苷酸序列(SEQ ID NO:136)与其互补序列(SEQ ID NO:137)一起显示于图16中。

[0506] 实施例6:具有双重截短的ActRIIB细胞外结构域的GDF阱的选择性配体结合

[0507] 在体外用Biacore<sup>TM</sup>仪器评价GDF阱和其他ActRIIB-hFc蛋白对若干种配体的亲和力。结果归纳于下表中。由于复合物极快地缔合与解离妨碍了k<sub>on</sub>和k<sub>off</sub>的准确测定,Kd值是通过稳态亲和力拟合来获得的。

[0508] ActRIIB-hFc变体的配体选择性:

[0509]

融合构建体	激活素A (Kd e-11)	激活素B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350.0	78.8	12.3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290.0	62.1	7.4

[0510] 具有截短的细胞外结构域的GDF阱ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的配体选择性相当于或超过较长变体ActRIIB(L79D 20-134)-hFc所展示的配体选择性,与缺少L79D取代的ActRIIB-hFc对应物相比具有显著损失的激活素A结合、部分损失的激活素B结合以及几乎完全保留的GDF11结合。注意,在此处所展示的配体中,仅截短物(不含L79D取代)未改变选择性[比较ActRIIB(L79 25-131)-hFc与ActRIIB(L79 20-134)-hFc]。ActRIIB(L79D 25-131)-hFc还保留强至中等的与Smad 2/3信号传导配体GDF8以及Smad1/5/8配体BMP6和BMP10的结合。

[0511] 实施例7:衍生自ActRIIB5的GDF阱

[0512] 其他人已经报道了ActRIIB的替代可溶形式(命名为ActRIIB5),其中外显子4(包括ActRIIB跨膜结构域)已经被不同的C末端序列置换(参见例如,WO 2007/053775)。

[0513] 不含其前导序列的天然人ActRIIB5的序列如下:

[0514] GRGEAETRECIYYNANWEERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFN CYDR QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTTIPSGGPEATAAGDQGSGALWLCLEGPAHE (SEQ

ID NO:68)

[0515] 可以如所述在天然位置79(加下划线)处进行亮氨酸至天冬氨酸的取代或其他酸性取代,以构建具有以下序列的变体ActRIIB5 (L79D) :

[0516] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDR  
QECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTTIPSGGPEATAAGDQGSGALWLCLLEGPAHE (SEQ  
ID NO:69)

[0517] 这种变体能以TGGG接头(单下划线)连接至人Fc(双下划线)以产生具有以下序  
列的人ActRIIB5 (L79D)-hFc融合蛋白:

[0518]

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAGDQGSGALWLCLLEGPAHETTGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFL  
FPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 70)。

[0519] 这种构建体可以在CHO细胞中表达。

[0520] 实施例8:ALK4:ActRIIB异二聚体的产生

[0521] 构建ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异聚复合物,其包含人ActRIIB和人ALK4的细胞外结构域,所述细胞外结构域各自单独地以定位于细胞外结构域与Fc结构域之间的接头融合至Fc结构域。各个构建体分别称为ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽,并且下面提供了各自的序列。

[0522] 与ActRIIB-Fc或ALK4-Fc同二聚体复合物相反,用于促进ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异聚复合物形成的方法是在Fc结构域的氨基酸序列中引入改变,以引导不对称异聚复合物的形成。在本公开文本中描述了使用Fc结构域制备不对称相互作用对的许多不同方法。

[0523] 在一种方法中,在SEQ ID NO:71和73以及SEQ ID NO:74和76的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc多肽序列中分别说明,一个Fc结构域发生改变以在相互作用面处引入阳离子氨基酸,而另一个Fc结构域发生改变以在相互作用面处引入阴离子氨基酸。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自使用组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[0524] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:71)如下所示:

[0525]

1 MDAMKRLGCC VLLL~~CGAVFV~~ SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS  
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE  
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC  
151 PAPELLGGPS VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVVDVSHE DPEVKFNWYV  
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
251 APIEKTI~~SKA~~ KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
301 EWESNGQOPEN NYKTTPPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH  
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 71)

[0526] 前导(信号)序列和接头加下划线。为了促进ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体而不是任何一种可能的同二聚体复合物的形成,可以将两个氨基酸取代(用赖氨酸置换酸性氨基酸)引入ActRIIB融合蛋白的Fc结构域中,如以上双下划线所示。SEQ ID NO:71的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[0527] 这种ActRIIB-Fc融合蛋白是由以下核酸序列(SEQ\_ID\_N0:72)编码:

[0528] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGCG TGAGGAGGCT GAGACACGGG  
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC  
 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC  
 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT  
 251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG  
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA  
 351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC  
 401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC  
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA  
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG  
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  
 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT  
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
 751 GCCCCCCATCG AGAAAACCCT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAAC  
 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCT CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAAGG  
 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG  
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
 951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCCTA CACGCAGAAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG  
 1101 TAAA (SEQ ID NO: 72)

[0529] [0530] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽(SEQ ID NO:73)如下,并且可以任选地从C末端去除赖氨酸(K)。

[0531]

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT  
 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA  
 101 GGPEVTYEPP PTAPGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS  
 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS  
 251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF  
 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[0532] (SEQ ID NO: 73)

[0533] ALK4-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:74)如下:

[0534]

```

1   MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51   GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSED LRNTHCCYTD
101  YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151  LFPPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201  REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251  QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
301  DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351  SLSPG      (SEQ ID NO: 74)

```

[0535] 前导序列和接头加下划线。为了用上述SEQ ID NO:71和73的ActRIIB-Fc融合多肽引导异二聚体形成,可以将两个氨基酸取代(用天冬氨酸置换赖氨酸)引入ALK4-Fc融合多肽的Fc结构域中,如以上双下划线所示。SEQ ID NO:74的氨基酸序列可以任选地提供为在C末端添加赖氨酸(K)。

[0536] 这种ALK4-Fc融合蛋白是由以下核酸(SEQ ID NO:75)编码:

[0537]

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCC GGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAACTCACA
401 CATGCCAACCC GTGCCAGCA CCTGAACCTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
451 CTCTTCCCCC CAAAACCAA GGACACCCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
501 GGTACACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCCT GAGGTCAAGT
551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
651 CCTGCACCAAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
701 ACAAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCAA AGCCAAAGGG
751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT

```

[0538]

801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA  
 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC  
 901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG  
 951 CGACCTCACCC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT  
 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC  
 1051 TCCCTGTCTC CGGGT (SEQ ID NO: 75)

[0539] 成熟ALK4-Fc融合蛋白序列(SEQ ID NO:76)如下,并且可以任选地在C末端添加赖氨酸(K)。

[0540]

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YT CETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV  
 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG  
 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL  
 251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSDGSSFF LYSDLTVDKS  
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 76)

[0541] SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:76的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc蛋白分别可以在CHO细胞系中共表达并从中纯化,以产生包含ALK4-Fc:ActRIIB-Fc的异聚复合物。

[0542] 在使用不对称Fc融合蛋白促进异多聚体复合物形成的另一种方法中,Fc结构域发生改变以引入互补疏水相互作用和另一个分子间二硫键,分别如SEQ ID NO:77和78以及SEQ ID NO:79和80的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc多肽序列中所说明。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自使用组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[0543] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:77)如下所示:

[0544]

1 MDAMKRLGCC VLLL~~CGAVFV~~ SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS  
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE  
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC  
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDSHE DPEVKFNWYV  
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
 251 APIEKTISKA KGQPRE~~P~~QVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDI~~A~~V  
 301 EWESNGQOPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

[0545]

351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 77)

[0546] 前导(信号)序列和接头加下划线。为了促进ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体而不是任何一种可能的同二聚体复合物的形成,可以将两个氨基酸取代(用半胱氨酸置换丝氨酸并用色氨酸置换苏氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中,如以上双下划线所示。SEQ ID NO:77的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[0547] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽如下:

[0548]

```

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101 GGPEVTVYEPP PTAPPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

```

(SEQ ID NO: 78)

[0549] ALK4-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:79)如下,并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[0550]

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSED LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSCHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYP PSDIAVEW ESNGQPENNY
301 KTPPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK      (SEQ ID NO: 79)

```

[0551] 前导序列和接头加下划线。为了用上述SEQ ID NO:77和78的ActRIIB-Fc融合多肽引导异二聚体形成,可以将四个氨基酸取代引入ALK4融合多肽的Fc结构域中,如以上双下划线所示。SEQ ID NO:79的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[0552] 成熟ALK4-Fc融合蛋白序列如下,并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[0553]

```

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDEPVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QOPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 80)

```

[0554] SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:80的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc蛋白分别可以在CHO细胞系中共表达并从中纯化,以产生包含ALK4-Fc:ActRIIB-Fc的异聚复合物。

[0555] 可以通过一系列柱色谱步骤实现各种ALK4-Fc:ActRIIB-Fc复合物的纯化,包括例如以任何顺序的以下步骤中的三步或更多步:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0556] 在使用不对称Fc融合蛋白促进异多聚体复合物形成的另一种方法中,Fc结构域发生改变以引入互补疏水相互作用、另一个分子间二硫键和两个Fc结构域之间的静电差异,以促进基于净分子电荷的纯化,如分别在SEQ ID NO:139-142和143-146的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc多肽序列中所说明。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自使用组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[0557] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:139)如下所示:

[0558]

```

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT ENQVSLWCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQOPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQD SLSLSPG (SEQ ID NO: 139)

```

[0559] 前导序列和接头加下划线。为了促进ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体而不是任何一种可能的同二聚体复合物的形成,可以将两个氨基酸取代(用半胱氨酸置换丝氨酸并用色氨酸置换苏氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中,如以上双下划线所示。为了促进ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的纯化,也可以将两个氨基酸取代(用酸性氨基酸置换赖氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中,如以上双下划线所示。SEQ ID NO:139的氨基酸序列可以任选地提供为在C末端添加赖氨酸。

[0560] 这种ActRIIB-Fc融合蛋白是由以下核酸(SEQ ID NO:140)编码:

[0561]

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGCG TGAGGGAGGCT GAGACACGGG  
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC  
151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC  
201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT  
251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG  
301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA  
351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC  
401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC  
451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA  
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG  
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT  
701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
751 GCCCCCCATCG AGAAAACCCT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACCC  
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCT CATGCCGGGA GGAGATGACC GAGAACCAAGG  
851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG  
901 GAGTGGGAGA GCAATGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
1051 GAGGCTCTGC ACAACCCTA CACGCAGGAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG  
1101 T (SEQ ID NO: 140)

[0562] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽如下(SEQ ID NO:141),并且可以任选地提供为在C末端添加赖氨酸。

[0563]

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT  
51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA  
101 GGPEVTVYEPP PTAPPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS  
201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC  
251 REEMTENQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF  
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQDSLSSL PG  
(SEQ ID NO: 141)

[0564] 这种ActRIIB-Fc融合多肽是由以下核酸(SEQ ID NO:142)编码:

[0565]

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACTG  
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC  
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCCT GGCGAACAG CTCTGGCACC  
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA  
201 TAGGCAGGAG TGTGTGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT  
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATT GCCAGAGGCT  
301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACCGGTGG  
351 TGGAACTCAC ACATGCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC  
401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC  
451 CGGACCCCTG AGGTACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC  
501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA  
551 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC  
601 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG  
651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA  
701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATGC  
751 CGGGAGGAGA TGACCGAGAA CCAGGTCAAG CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG  
801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG  
851 AGAACAAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC  
901 TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGAA  
951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAAC CACTACACGC  
1001 AGGACAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGT (SEQ ID NO: 142)

[0566] ALK4-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:143)如下,并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0567]

```

1      MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51     GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSED LRNTHCCYTD
101    YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151    LFPPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201    REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251    QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQPENNY
301    KTPPPVLDSR GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351    SLSPGK      (SEQ ID NO: 143)

```

[0568] 前导序列和接头加下划线。为了用上述SEQ ID NO:139和141的ActRIIB-Fc融合多肽引导异二聚体形成,可以将四个氨基酸取代(用半胱氨酸置换酪氨酸,用丝氨酸置换苏氨酸,用丙氨酸置换亮氨酸,并用缬氨酸置换酪氨酸)引入ALK4融合多肽的Fc结构域中,如以上双下划线所示。为了促进ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的纯化,也可以将两个氨基酸取代(用精氨酸置换天冬酰胺并用精氨酸置换天冬氨酸)引入ALK4-Fc融合多肽的Fc结构域中,如以上双下划线所示。SEQ ID NO:143的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0569] 这种ALK4-Fc融合多肽是由以下核酸(SEQ ID NO:144)编码:

[0570]

```

1      ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
101    TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
151    GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
201    GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
251    ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
301    TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
351    TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAACTCACA
401    CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
451    CTCTTCCCCC CAAAACCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
501    GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
551    TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
601    CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT

```

[0571]

651 CCTGCACCAAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA  
701 ACAAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCAAAGGG  
751 CAGCCCCGAG AACCAACAGGT GTGCACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT  
801 GACCAAGAAC CAGGTCAAGCC TGTCCCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA  
851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA GAACAACATAC  
901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCCAGC GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG  
951 CAAGCTCACCA GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT  
1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC  
1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO: 144)

[0572] 成熟ALK4-Fc融合多肽序列如下(SEQ ID NO:145),并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0573]

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLGME HHVRTCIPKV  
51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG  
101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
151 VSHEDEPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL  
251 SCAVKGFYPS DIAVEWESRG QPENNYKTTP PVLDSRGSFF LVSKLTVDKS  
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 145)

[0574] 这种ALK4-Fc融合多肽是由以下核酸(SEQ ID NO:146)编码:

[0575]

1 TCCGGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA CCAGCTGCCT  
 51 CCAGGCCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG GTTCCATT  
 101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT CCCCAAAGTG  
 151 GAGCTGGTCC CTGCCGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT CGGAGGACCT  
 201 GCGCAACACC CACTGCTGCT ACACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA  
 251 GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGC  
 301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC  
 351 TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCCAAGG  
 401 ACACCCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 451 GTGAGCCACG AAGACCCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT  
 501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA  
 551 CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT

[0576]

601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCAT  
 651 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT  
 701 GCACCCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAAGCCTG  
 751 TCCTGCGCCG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATGCCG TGGAGTGGGA  
 801 GAGCCGCGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 851 ACTCCCGCGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC  
 901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT  
 951 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAA

(SEQ ID NO: 146)

[0577] SEQ ID NO:141和SEQ ID NO:145的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc蛋白分别可以在CHO细胞系中共表达并从中纯化,以产生包含ALK4-Fc:ActRIIB-Fc的异聚复合物。

[0578] 可以通过一系列柱色谱步骤实现各种ALK4-Fc:ActRIIB-Fc复合物的纯化,包括例如任何顺序的以下步骤中的三步或更多步:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱、阳离子交换色谱、基于表位的亲和色谱(例如,采用针对ALK4或ActRIIB上的表位的抗体或功能等效配体)和多元色谱(例如,采用含有静电配体和疏水性配体的树脂)。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0579] 实施例9.ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体相比的配体结合概况

[0580] 使用基于Biacore<sup>TM</sup>的结合测定来比较上述ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体复合物

的配体结合选择性与ActRIIB-Fc和ALK4-Fc同二聚体复合物的配体结合选择性。使用抗Fc抗体将ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体、ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体独立地捕获至系统上。注射配体并使其流过所捕获的受体蛋白。结果归纳于下表中，其中最指示有效配体阱的配体解离速率( $k_d$ )由灰色阴影指示。

[0581]

ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的配体与 ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体相比的配体结合概况			
配体	ActRIIB-Fc 同二聚体	ALK4-Fc 同二聚体	ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚 体

[0582]

	$k_a$ ( 1/Ms )	$k_d$ ( 1/s )	$K_D$ ( pM )	$k_a$ ( 1/Ms )	$k_d$ ( 1/s )	$K_D$ ( pM )	$k_a$ ( 1/Ms )	$k_d$ ( 1/s )	$K_D$ ( pM )
激活素 A	$1.2 \times 10^7$	$2.3 \times 10^{-4}$	19	$5.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	20000	$1.3 \times 10^7$	$1.5 \times 10^{-4}$	12
激活素 B	$5.1 \times 10^6$	$1.0 \times 10^{-4}$	20	没有结合			$7.1 \times 10^6$	$4.0 \times 10^{-5}$	6
BMP6	$3.2 \times 10^7$	$6.8 \times 10^{-3}$	190	---			$2.0 \times 10^6$	$5.5 \times 10^{-3}$	2700
BMP9	$1.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^{-3}$	77	---			短暂*		3400
BMP10	$2.3 \times 10^7$	$2.6 \times 10^{-4}$	11	---			$5.6 \times 10^7$	$4.1 \times 10^{-3}$	74
GDF3	$1.4 \times 10^6$	$2.2 \times 10^{-3}$	1500	---			$3.4 \times 10^6$	$1.7 \times 10^{-2}$	4900
GDF8	$8.3 \times 10^5$	$2.3 \times 10^{-4}$	280	$1.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^{-3}$	15000†	$3.9 \times 10^5$	$2.1 \times 10^{-4}$	550
GDF11	$5.0 \times 10^7$	$1.1 \times 10^{-4}$	2	$5.0 \times 10^6$	$4.8 \times 10^{-3}$	270†	$3.8 \times 10^7$	$1.1 \times 10^{-4}$	3

\* 由于相互作用的短暂性质而不确定

† 极低的信号

--- 未测试

[0583] 这些比较性结合数据证明ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体相对于ActRIIB-Fc或ALK4-Fc同二聚体具有改变的结合概况/选择性。ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体展示出与任一种同二聚体相比增强的与激活素B的结合,保留如用ActRIIB-Fc同二聚体所观察到的与激活素A、GDF8和GDF11的强结合,并且展现出显著降低的与BMP9、BMP10和GDF3的结合。具体地,BMP9对ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体展示出低或不可观察到的亲和力,而这种配体与ActRIIB-Fc同二聚体强烈结合。与ActRIIB-Fc同二聚体一样,所述异二聚体保留中等水平的与BMP6的结合。参见图19。

[0584] 另外,使用A-204报告基因测定评价ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体对通过激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、BMP10和BMP9进行的信号传导

的影响。细胞系:人横纹肌肉瘤(衍生自肌肉)。报告载体:pGL3(CAGA)12(如Dennler等人,1998,EMBO 17:3091-3100中所述)。CAGA12基序存在于TGF $\beta$ 反应性基因(PAI-1基因)中,因此这种载体通常用于通过Smad2和3进行的因子信号传导。以下概述了示例性A-204报告基因测定。

[0585] 第1天:将A-204细胞分离至48孔板中。

[0586] 第2天:用10ug pGL3(CAGA)12或pGL3(CAGA)12(10ug)+pRLCMV(1ug)和Fugene转染A-204细胞。

[0587] 第3天:添加因子(稀释至培养基中+0.1%BSA)。在添加至细胞之前,抑制剂需要与因子一起预孵育约一小时。约六小时后,用PBS冲洗细胞,然后裂解。

[0588] 在上述步骤后,进行荧光素酶测定。

[0589] 在这个测定中确定ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体二者都是激活素A、激活素B、GDF11和GDF8的有效抑制剂。具体地,如在图19中所示的比较性同二聚体/异二聚体IC<sub>50</sub>数据中可见,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体类似地抑制激活素A、激活素B、GDF8和GDF11信号传导途径。然而,与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体相比,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体对BMP9和BMP10信号传导途径的抑制显著降低。此数据与上述结合数据一致,其中观察到ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体均展示出与激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的强结合,但是与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体相比,BMP10和BMP9对ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的亲和力显著降低。

[0590] 总之,这些数据因此证明,与ActRIIB-Fc同二聚体相比,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体是激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的更具选择性的拮抗剂。因此,ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体在这种选择性拮抗作用是有利的某些应用中比ActRIIB-Fc同二聚体更有用。例子包括需要保留激活素A、激活素B、激活素AC、GDF8和GDF11中的一种或多种的拮抗性而使BMP9、BMP10、GDF3和BMP6中的一种或多种的拮抗性降至最低的治疗应用。

[0591] 实施例10.TGF $\beta$ RII-Fc融合蛋白的产生

[0592] 人TGF $\beta$ RII以至少两种亚型天然地出现:A(长)和B(短),所述亚型是通过细胞外结构域(ECD)中的可变剪接来产生(图10和11)。TGF $\beta$ RII以高亲和力结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3。如下文所详述,产生包含TGF $\beta$ RII长亚型(T $\beta$ RII<sub>L</sub>)的细胞外结构域的TGF $\beta$ RII-Fc融合蛋白。

[0593] 野生型hT $\beta$ RII<sub>L</sub>(23-184)序列如下所示(SEQ ID NO:147),其中25个氨基酸的插入物加下划线。注意,剪接在插入物C末端的侧接位置处产生保守氨基酸取代(Val→Ile)。若干种hT $\beta$ RII<sub>S</sub>变体与其hT $\beta$ RII<sub>L</sub>对应物之间的序列关系指示于图24中。

[0594]

```

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNNGAVKF
51 PQLCKFCDFVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCVAV WRKNDENITL
101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
151 IFSEEVNTSN PD (SEQ ID NO: 147)

```

[0595] 产生hT $\beta$ RII<sub>L</sub>(23-184)-Fc融合蛋白,其中hT $\beta$ RII<sub>L</sub>(23-184)结构域在C末端(通过接头)融合至人IgG1Fc结构域,并且在N末端融合至TPA前导序列,所述融合蛋白具有以下氨

基酸序列(SEQ ID NO:148) :

[0596]

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN  
51 RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCI  
101 TSICEKPQE**V** CVAVWRKNDE NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM  
151 KEKKKPG**E**TF FMCSCSSDEC NDNIIFSEYY NTSNPDTGGG THTCPPCPAP  
201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV  
251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI  
301 EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE  
351 SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL  
401 HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 148)

[0597] N末端前导序列和C末端Fc结构域通过单下划线表示，并且接头结构域由双下划线指示。编码hT $\beta$ RII长(23-184)-Fc融合蛋白的核苷酸序列具有以下核苷酸序列(SEQ ID NO:149) :

[0598]

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
AGTCTTCGTT

[0599]

61 TCGCCC GGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG ATGTGGAAAT  
GGAGGCCAG

121 AAAGATGAAA TCATCTGCC CAGCTGTAAT AGGACTGCC ATCCACTGAG  
ACATATTAAT

181 AACGACATGA TAGTCACTGA CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAACT  
GTGTAAATT

241 TGTGATGTGA GATTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA  
CTGCAGCATC

301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA  
GAATGACGAG

361 AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC CCTACCATGA  
CTTTATTCTG

421 GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG  
TGAGACTTTC

481 TTCATGTGTT CCTGTAGCTC TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC  
AGAAGAATAT

541 AACACCAGCA ATCCTGACAC CGGTGGTGG ACTCACACAT GCCCACCGTG  
CCCAGCACCT

601 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCAA AACCCAAGGA  
CACCCCTCATG

661 ATCTCCCGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGACG TGAGCCACGA  
AGACCCTGAG

721 GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA ATGCCAAGAC  
AAAGCCCGCG

781 GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT  
GCACCAGGAC

841 TGGCTGAATG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC  
AGCCCCCATC

901 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAAC CACAGGTGTA  
CACCCCTGCC

961 CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACAG GTCAGCCTGA CCTGCCTGGT

[0600]

CAAAGGCTTC

1021 TATCCCAGCG ACATGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC AGCCGGAGAA

CAACTACAAG

1081 ACCACGCCTC CCGTGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTATAGCAA

GCTCACCGTG

1141 GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA

TGAGGCTCTG

1201 CACAACCAC ACTACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG GTAAATGA (SEQ

ID NO: 149)

[0601] hT $\beta$ RII长(23-184)-Fc融合蛋白的经加工形式具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO: 150) :

TIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN

RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCASI

TSICEKPQEVCVAVWRKNDE NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM

KEKKKPGETF FMCSRSSDEC NDNIIFSEYY NTSNPDTGGG THTCPPCPAP

[0602] ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV

EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI

EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE

SNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 150)

[0603] hT $\beta$ RII长(23-184)-Fc融合蛋白是在CHO细胞中表达,并且通过过滤和蛋白质A色谱从条件培养基中纯化。通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分析来评价用于报告基因测定的样品的纯度。

[0604] 对于本文所述的在某些动物模型中的使用,产生包含来自小鼠T $\beta$ RII亚型1的成熟全长ECD的Fc融合蛋白,其在本文中被命名为mT $\beta$ RII长-Fc。小鼠T $\beta$ RII亚型1与人T $\beta$ RII亚型A(长形式)同源,并且因此是上述hT $\beta$ RII长(23-184)-Fc融合蛋白的小鼠对等形式。与人类形式一样,确定mT $\beta$ RII长-Fc以高亲和力(皮摩尔)结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3结合,但是不结合至TGF $\beta$ 2。另外,在基于细胞的测定中确定,hT $\beta$ RII长(23-184)-Fc融合蛋白和mT $\beta$ RII长-Fc是TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3活性的有效抑制剂,但是不抑制TGF $\beta$ 2活性。

[0605] 实施例11:ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂的抗肿瘤活性

[0606] 在同基因鼠类白血病模型中研究ActRIIA-mFc (SEQ ID NO:50的小鼠Fc形式)、ActRIIB-mFc (SEQ ID NO:58的小鼠Fc形式) 和T $\beta$ RII长(23-184)-mFc (SEQ ID NO:150的小鼠Fc形式)融合蛋白的潜在抗肿瘤活性。将8周龄BALB/c小鼠随机分配至处理组(n=10只/组),并在给予癌细胞之前两天开始,每周用ActRIIA-mFc (10mg/kg)、ActRIIB-mFc (10mg/

kg)、T $\beta$ RII长(23-184)-mFc (10mg/kg) 或媒介物(磷酸盐缓冲盐水,PBS,5ml/kg) 腹膜内处理两次。在第0天,向每只小鼠皮下接种悬浮于PBS (100 $\mu$ L) 中的1x 10<sup>6</sup>个RL $\circ$ 1 (RLmale1) 细胞。RLmale1是BALB/c来源的x射线诱导的白血病(SatoH等人,1973,J Exp Med 138:593-606)。在接种小鼠后,每周测量两次体重和肿瘤体积。根据用卡尺获得的二维测量值计算肿瘤体积:肿瘤体积(以mm<sup>3</sup>计)=(L×W×W)/2,其中L和W分别是肿瘤长度和宽度(以mm计)。肿瘤完全消退和无肿瘤存活二者都是根据以下文献来定义:Teicher BA(编辑)Anticancer Drug Development Guide:Preclinical Screening,Clinical Trials, and Approval;Humana Press,1997。根据当地IACUC法规,用于存活分析的终点是肿瘤体积大于2000mm<sup>3</sup>、体重损失大于20%、或后肢麻痹。通过中值存活以及通过对数秩(Mantel-Cox)检验来比较不同组的存活曲线。

[0607] 如下表中所示,ActRIIA-mFc和ActRIIB-mFc二者都展现出抗肿瘤活性。然而,T $\beta$  RII长(23-184)-mFc在这个模型中未显示任何可察觉的抗肿瘤活性。

[0608]

测试物品	品系	n	剂量 ( mg/kg )	途 径	时间 表	无肿瘤% ( 第56天 )	中值存 活( 天 )
媒介物	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	15
ActRIIA-mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	20	21.5
ActRIIB-mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	20	32.5
T $\beta$ RII长 (23-184)-mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	0	17

[0609] 用ActRIIA-mFc或ActRIIB-mFc处理导致10只小鼠中有2只(20%)在第56天具有无肿瘤状态,与之相比,媒介物和T $\beta$ RII长(23-184)-mFc处理的小鼠没有一只在第56天具有无肿瘤状态。增加的中值存活和在对数秩检验中的高显著性也指示,ActRIIA-mFc和ActRIIB-mFc各自延长了荷瘤小鼠的存活。对ActRIIB-mFc的初始反应特别稳健,因为50%的ActRIIB-mFc处理的小鼠截至第34天显示肿瘤完全消退,与之相比,在媒介物处理组中没有小鼠截至第34天显示肿瘤完全消退。这些结果显示,ActRIIA-mFc和ActRIIB-mFc在体内具有抗肿瘤活性,指示这些蛋白质以及其他ActRII拮抗剂可以用于治疗癌症。相比之下,T $\beta$  RII长(23-184)-mFc的数据表明,TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3的抑制不足以促进抗肿瘤反应。

[0610] 然后使用相同的鼠类白血病模型评估ActRIIB-hFc (SEQ ID N0:58的同二聚体) 是否具有与ActRIIB-mFc的抗肿瘤活性类似的抗肿瘤活性,以及抗肿瘤活性是否依赖于T细胞介导的免疫。将8周龄BALB/c小鼠随机分配至处理组(n=10只/组),并在给予癌细胞之前两天开始,每周用ActRIIB-mFc (10mg/kg)、ActRIIB-hFc (10mg/kg) 或媒介物(PBS,5ml/kg) 腹膜内处理两次。另外,将具有缺陷性T细胞免疫的7周龄NCr裸小鼠随机分配至处理组(n=10只/组),并在给予癌细胞之前两天开始,每周用ActRIIB-mFc (10mg/kg)、ActRIIB-hFc (10mg/kg) 或媒介物(PBS,5ml/kg) 腹膜内处理两次。最后,在上述实验期间已保持无肿瘤大约7周的4只小鼠(两只小鼠用ActRIIA-mFc处理并且两只小鼠用ActRIIB-mFc处理)再次用

RLmale1细胞激发,以测试抗肿瘤免疫记忆。在第0天,向每只小鼠皮下接种悬浮于PBS(100 $\mu$ L)中的1x10<sup>6</sup>个RL $\circlearrowleft$ 1(RLmale1)细胞。在小鼠接种后,每周测量两次体重和肿瘤体积。根据当地IACUC法规,用于存活分析的终点是肿瘤体积大于2000mm<sup>3</sup>、体重损失大于20%、或后肢麻痹。

[0611] 如下表中所示,ActRIIB-mFc和ActRIIB-hFc的抗肿瘤效果取决于小鼠品系。

[0612]

测试物品	品系	n	剂量 (mg/kg)	途径	时间 表	无肿瘤% (第56 天)	中值存 活(天)	对数秩检 验 (P值)
媒介物	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	17	--
ActRIIB- mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	10	36	0.002
ActRIIB- hFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	30	27.5	0.003
媒介物	NCr裸	10	--	i.p.	biw	0	12	--

[0613]

ActRIIB- mFc	NCr裸	10	10	i.p.	biw	0	12	0.07
ActRIIB- hFc	NCr裸	10	10	i.p.	biw	0	12	0.03
ActRIIA- mFc	BALB/c	2	--	--	--	100	--	--
ActRIIB- mFc	BALB/c	2	--	--	--	100	--	--

[0614] 在有免疫能力的BALB/c小鼠中,ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc二者都展现出抗肿瘤活性,如下表中所示。用ActRIIB-mFc或ActRIIB-hFc处理分别导致10%或30%的小鼠在第56天具有无肿瘤状态,与之相比,媒介物处理的小鼠没有一只在第56天具有无肿瘤状态。增加的中值存活和在对数秩检验中的高显著性也证明,ActRIIB-mFc和ActRIIB-hFc各自促进了荷瘤小鼠的存活。重要的是,与BALB/c相比,ActRIIB-mFc和ActRIIB-hFc的抗肿瘤效果在NCr裸小鼠中不存在或显著钝化,由此在这些ActRIIB配体抑制剂的作用机制中牵涉T细胞免疫。此外,虽然用RLmale1肿瘤细胞重复接种,但是从先前实验延续的所有4只无肿瘤小鼠在整个当前实验期间都展现出不可检测到的肿瘤生长。这些结果进一步证实,在BALB/c背景上,免疫细胞介导通过用ActRIIA-mFc或ActRIIB-mFc治疗引起的RLmale1肿瘤的消退,并

且有效抗肿瘤免疫应答产生对肿瘤抗原的免疫记忆。此外,这些结果确认了ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc在体内的抗肿瘤活性,并且在这种活性中密切地牵涉T细胞免疫。总之,数据表明,ActRII拮抗剂可以用于在体内增强免疫活性,并且因此此类拮抗剂可以用于治疗需要提高的免疫活性的多种障碍和病症(例如,免疫-肿瘤学应用以及多种病原体的治疗)。

[0615] 实施例12:ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂组合疗法的抗肿瘤活性

[0616] 使用与实施例11中所述相同的鼠类白血病模型,申请人然后研究了ActRIIB-hFc抗肿瘤活性是否可以通过将其与TGF $\beta$ 拮抗剂组合来增强。对于组合研究,使用泛特异性TGF $\beta$ 抗体(以高亲和力结合至TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3的TGF $\beta$ 抗体)作为TGF $\beta$ 拮抗剂。

[0617] 将8周龄BALB/c小鼠随机分配至处理组(n=10只/组),并在给予瘤细胞之前两天开始,每周用ActRIIB-hFc(10mg/kg)、TGF $\beta$ 抗体(mAb)(10mg/kg)、ActRIIA-hFc与TGF $\beta$ mAb的组合(二者都是10mg/kg)或媒介物(磷酸盐缓冲盐水,PBS,5ml/kg)处理两次。在第0天,向每只小鼠皮下接种悬浮于PBS(100 $\mu$ L)中的1x 10<sup>6</sup>个RL $\circlearrowleft$ 1(RLmale1)细胞。RLmale1是BALB/c来源的x射线诱导的白血病(Sato H等人,1973,J Exp Med 138:593-606)。在接种小鼠后,如先前实施例中所述,每周测量两次体重和肿瘤体积。通过中值存活以及通过对数秩(Mantel-Cox)检验来比较不同组的存活曲线。

[0618] 如下表中所示,使用ActRII拮抗剂和TGF $\beta$ 拮抗剂的组合疗法展现出大于针对单独的每种拮抗剂所观察到的抗肿瘤活性的抗肿瘤活性。

[0619]

测试物品	品系	n	剂量 (mg/kg)	途径	时间表	无肿瘤% (第56天)	中值存 活(天)
媒介物	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	15
ActRIIB- hFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	30	17
TGF $\beta$ mAb	BALB/c	10	10	i.p.	biw	20	15
组合	BALB/c	10	10 (每种药 剂)	i.p.	biw	70	>31

[0620] 用单独的ActRIIB-hFc或单独的TGF $\beta$ mAb处理在这个模型中显示出对肿瘤消退的适度影响,分别有30%和20%的无肿瘤状态。用ActRIIB-hFc和TGF $\beta$ mAb组合处理导致抗肿瘤活性的令人惊讶并且显著的增加,70%的无肿瘤状态并且中值存活时间大致加倍。这种类型的协同作用通常被视为证实了单独药剂是通过不同的细胞机制发挥作用。因此,虽然ActRII或TGF $\beta$ RII信号传导途径的抑制可能促进抗肿瘤活性,但是可以使用两种途径的抑制在需要提高的抗肿瘤活性的此类实验或临床情况下协同提高抗肿瘤活性。总之,这些数据指示,ActRII和TGF $\beta$ 拮抗剂可以单独用于治疗癌症,但是特别是组合用于治疗癌症。

[0621] 此外,根据上文关于T $\beta$ RII<sub>长</sub>(23-184)-mFc的数据(没有观察到其在这个模型中具有任何抗肿瘤活性),单独的TGF $\beta$ mAb治疗的抗肿瘤活性是令人惊讶的。这可以提供对TGF $\beta$ 信号传导途径的抗肿瘤活性的机制的进一步了解。如先前所述,在基于细胞的测定中,T $\beta$

RII<sub>長</sub>(23-184)-mFc以高亲和力结合至TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3，并且可以中和TGF $\beta$ 1和TGF $\beta$ 3信号传导。然而，T $\beta$ RII<sub>長</sub>(23-184)-mFc不结合至TGF $\beta$ 2。相比之下，这项研究中使用的TGF $\beta$ mAb以高亲和力结合至TGF $\beta$ 的所有三种亚型(TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3)。鉴于活性的差异，这些数据指示与TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3相比，TGF $\beta$ 2对于肿瘤发展可能更重要。因此，至少抑制TGF $\beta$ 2活性的TGF $\beta$ 拮抗剂可以用于促进抗肿瘤反应。此外，数据表明，TGF $\beta$ 2拮抗剂可以与ActRII拮抗剂协同地用于提高抗肿瘤活性，并且因此这种组合疗法可以用于治疗癌症。

[0622] 通过引用并入

[0623] 本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体特此并入，如同每个单独的出版物或专利被明确且单独地指出通过引用并入一样。

[0624] 虽然已经讨论了主题的特定实施方案，但是上述说明书是说明性的而非限制性的。在审阅本说明书和以下权利要求后，许多变化对于本领域技术人员而言将变得清楚。本发明的全部范围应通过参考权利要求及其等同物的全部范围以及说明书和此类变化来确定。

ActRIIa ILGRSETQEC LFENANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS  
ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNOSGLERC EGEQDKRLNC YASWRNSSGT

IEIVKOGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM  
IELVKKGWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPP  
GGPEVTVYEPP PTAPT

图1

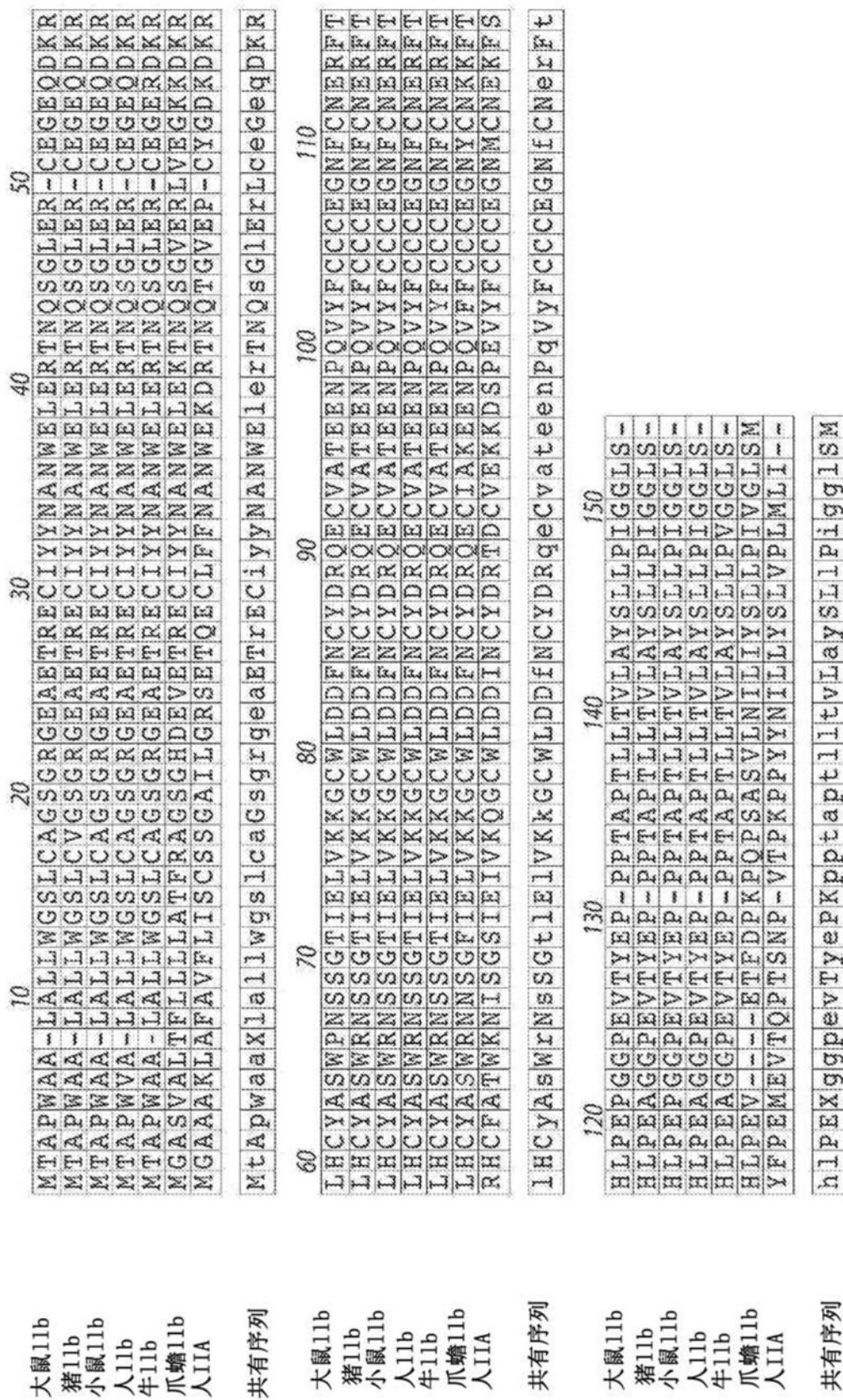


图2

人	绵羊	鼠	小鼠	鸡	母牛	猫头鹰	蝙蝠
ILGRSETQEC							
ILFENANWEKD	IFYNNANWERD	LFENANWERD	RTNQTGVEPC	RTNRTGVEPC	RTNQTGVEPC	RTNQTGVEPC	RTNQTGVEPC
10	10	10	20	20	30	40	50
CVEKKDRRID	CIEKKDRRID						
DDINCYCWL							
60	70	80	90	100			
IEIVKQGCWL							
人	绵羊	鼠	小鼠	鸡	母牛	猫头鹰	蝙蝠
EVTQOPTSNPV							

图3

图4

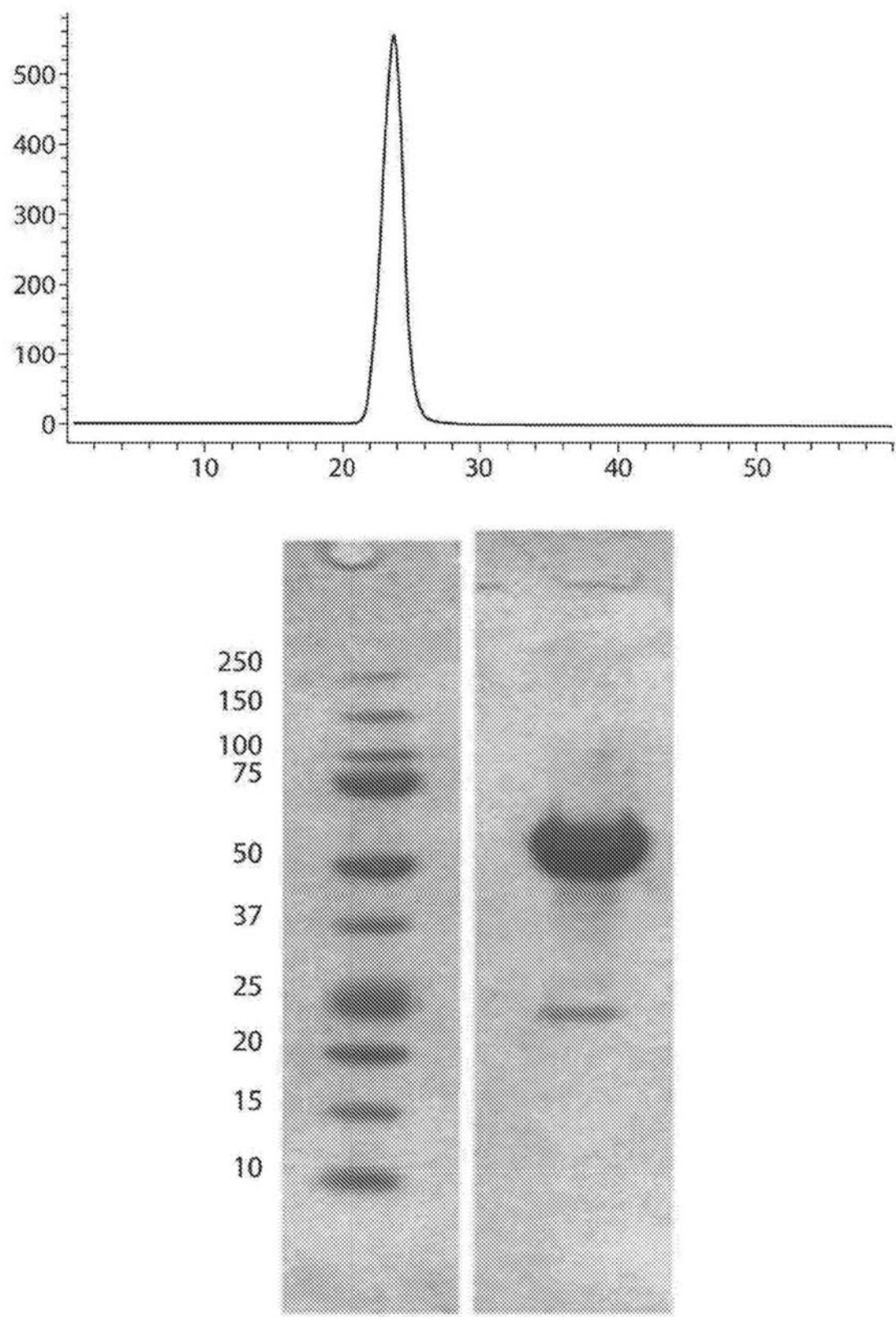


图5

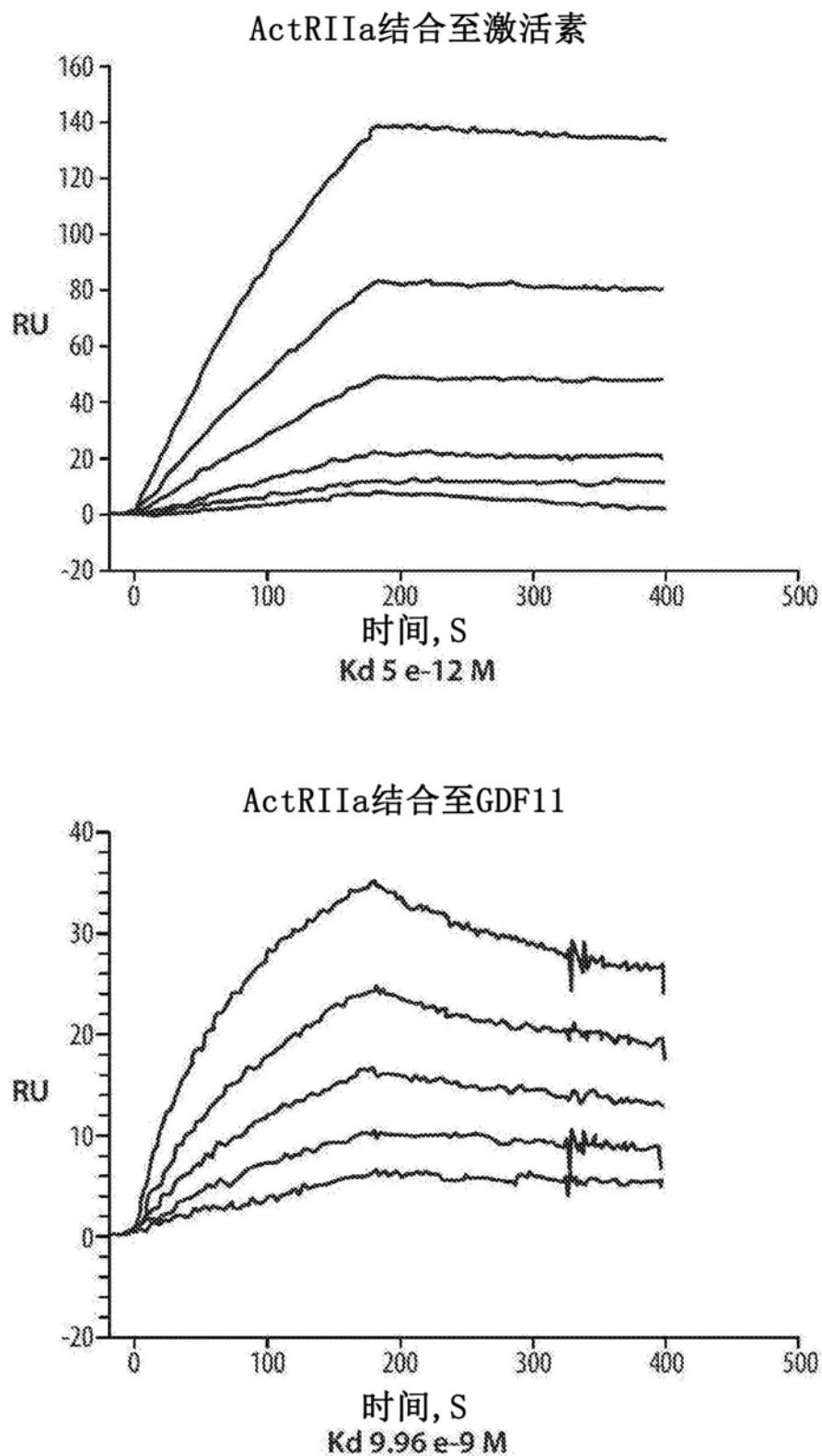


图6

1 MDAMKRLGCC VLLLCAVVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC  
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV  
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG  
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA  
201 KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNKG EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS  
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP  
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT  
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:123)

图7

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 A E T R E C I Y Y  
AGTCTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTC ATCTACTACA  
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC  
TGCCTTGAC CCTCGACCTC GCCTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
GAAGGGAGC AGGACAAGCG GCTGCACCTGC TACGCCCTCCT GGCACAAACAG  
CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCACGTTGTC

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

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

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

351 P E A G G P E V T Y E P P P T  
GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG  
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGG  
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGAGG TTCCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGAC  
GGCCTGGGG CACTCAGTGT CCGACCCACCA CCTGCACACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA CGAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTGTC CACATGTGGG ACGGGGTAG

图8

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCA CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
  
851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
CGAACGATAGG GTGCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
  
901 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCCTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
  
951 CTTCCCTCAT AGCAAGCTCA CGGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTGCGTCCCCCT  
  
1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
TGCAGAAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
  
1051 CAGAACAGGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO:124)  
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO:125)

图8续

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG  
 A E T R E C I Y Y  
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTATTACAA  
 TCAGAACCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT  
 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 101 ATGCTAATTG CGAACCTCGAA CCGACGAAACC AATCCGGGCT CGAACCGTGT  
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCGA GCTTGCCACA  
 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 151 GAGGGGAAAC AGGATAAACG CCTCCATTCG TATGCCGTGT GGAGGAACTC  
 CTCCCCCTTG TCCTATTGCG GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG  
 S G T I E L V K K G C W L D D F  
 201 CTCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACCAATTCA  
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT  
 N C Y D R Q E C V A T E E N P O V  
 251 ATTGTTATGAA CCGCCAGGAA TGTGTGCGGA CCCAAGAGAAA TCCGCAGGTC  
 TAACAATACT GGCGGTCCCT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG  
 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 301 TATTTCTGTT GTTGCAGGG GAATTCTGT AATGAAACGGT TTACCCACCT  
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA  
 P E A G G P E V T Y E P P P T  
 351 CCGCGAAAGCC GGCAGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCCG CCCACCCGGTG  
 GGGGCTTCGG CCGCCCCGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC  
 GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGGA  
 401 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT  
 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 451 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG  
 CCGGACCCCT GAGGTACACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACCC  
 501 GGCCTGGGA CTCCAGTGTG CCGACCCACCA CCTGCACACTCG GTGCTTCTGG  
 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 551 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG  
 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 601 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 651 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
 701 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGTAG

图9

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCA G CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GCCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAACGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
 901 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
 951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCTGCCCT  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAACAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 126)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO: 127)

图9续

1 mrgllrlglw plhivlwtri astippvhvk synndmivtd nngavkfpql  
 51 ckfcdrvrfst cdnqkscmsn csitsicekp qevcvavwrk ndenitletv  
 101 chdpklyhd filedaaspk cimkekppg etffmcscss decndniifs  
 151 eeynntsnpdl llvifqvtgi sllpplgvai sviiifycyr vnrqqklsst  
 201 wetgktrklm efsehcail eddrsdisst canninhnte llpieldtlv  
 251 gkgrfaevyk aklkqntseq fetvavkifp yeeyaswkte kdifsdinlk  
 301 henilqflta eerktelgkq ywlitafhak gnlqeyletrh viswedlrkl  
 351 gsslargiah lhsdhtpogr pkmpivhrdl kssnilvknd ltccclcdfgl  
 401 slrlldptlsv ddlansqvg tarymapevl esrmnlenve sfkqtdvysm  
 451 alvlwemtsr cnaygevkdy eppfgskvre hpcvesmkdn vldrgrpei  
 501 psfwlnhqgi qmvctltec wdhdpearlt aqcvaerfse lehldrlnsgr  
 551 scseekiped gslnntk (SEQ ID NO: 34)

图10

1 mgrgllrglw plhivlwtri astippvhqk sdvemeaqkd eiicpscnrt  
 51 ahplrhinnd mivtdnngav kfpqlckfcd vrfstcdnqk scmsnscsits  
 101 icekpqevcv avwrkndeni tletvchdpk lpyhdfiled aaspkcimke  
 151 kkkpgetffm csossdecnd niifseeynt snpdlllvif qvtgisllpp  
 201 lgvaisviii fycyrvnrqq klsstwetgk trklmefseh caiileddrs  
 251 disstcanni nhntellpie ldtlvkgkgrf aevykaklkq ntseqfetva  
 301 vkifpyeeya swktekdfis dinlkhenil qfltaeerkt elgkqywlit  
 351 afhakgnlqe yltrhviswe dlrklgssla rgiahlhsdh tpcgrpkmpl  
 401 vhrdlkssni lvkndlcccl cdfqlslrld ptlsvddlan sgqvgtarym  
 451 apevlesrmn lenvesfkqt dvysmalvlw emtsrcnavg evkdyeppfg  
 501 skvrehpvcve smkdnvlrdr grpeipsfwl nhqgiqmvc e tltecwdhdp  
 551 earltaqcva erfselehld rlsqrscsee kipedgsln tk

(SEQ ID NO: 35)

图11

1 MDAMKRLGCC VLLLCAVVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSLERC  
 51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKG**CWD** DDPNCYDRQE CVATEENPQV  
 101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG  
 151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA  
 201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI  
 251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP  
 301 ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT  
 351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 131)

图12

1   ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
51   KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
101   TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPRVTCV  
151   VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTAKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
201   WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLR PSREEMTKNQ  
251   VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTW  
301   DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:132)

图13

1   ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
51   KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
101   TYEPPPT (SEQ ID NO:133)

图14

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG  
 E T R E C I Y Y  
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA  
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT  
 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 101 ACGCCAACGT GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC  
 TGCCTGAC CCTCGACCTC GCCTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG  
 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 151 GAAGGGGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGAACAG  
 CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCAGGAGGA CCAGCTTGTC  
 S G T I E L V K K G C W D D D F  
 201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA  
 GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCCTG CTACTGAAGT  
 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
 251 ACTGCTACGA TAGGCAGGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCCAGGTG  
 TGACGATGCT ATCCGTCCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC  
 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATT  
 ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAAGTAAA  
 P E A G G P E V T Y E P P P T  
 351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG  
 CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC  
 401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CGTGCCCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGGGA  
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT  
 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGAGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG  
 501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACCC  
 GGCCTGGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCAACCA CCTGCACCTCG GTGCTTCTGG  
 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC CTGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

图15

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTOGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGTTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
 901 GAGAACAACT ACAAGACACAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGTA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
 951 CTTCCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCC  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 134)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO: 135)

图15续

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG  
 E T R E C I Y Y  
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTATTACA  
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT  
 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 101 ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT  
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCCGA GCTTGCCACA  
 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 151 GAGGGGGABC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC  
 CTCCCCCTTG TCCTATTGTC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG  
 S G T I E L V K K G C W D D D F  
 201 CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA  
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTCC CACGACCCCTG CTGCTAAAGT  
 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
 251 ATTGTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGGCA CCGAAGAGAA TCCCGAGGT  
 TAACAATACT GGCGGTCCCT ACACAGCGCT GGCTCTCTT AGGCGTCCAG  
 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 301 TATTCTGTT GTTGCAGGG GAATTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT  
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA  
 P E A G G P E V T Y E P P P T  
 351 CCCCGAAGCC GGCGGGCCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCCGGT  
 GGGGCTTCGG CCGCCCCGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGGTGGCCAC  
 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTCCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGA  
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT  
 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG  
 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
 501 GGCCTGGGA CTCCAGTGT CGCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG  
 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG  
 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 601 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

图16

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
 901 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA TGTTCGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGGCGAGGAA  
 951 CTTCCCTCAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 136)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 137)

图16续

GAAAC CCGCGAATGT ATTTTATTACA ATGCTAATG GGAACTCGAA CGGACGAAC  
 AATCCGGGCT CGACGGTGT GACGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCCTCGT  
 GGAGGAACT CTCCGGGACCG ATTGAACTGG TCAAGAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA  
 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTCCGCGA CCGAAGAGAA TCCGGCAGGTC TATTTCTGTT  
 GTGCGAGGG GAATTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGGCC GGGGGGCCCG  
 AGGTGACTA TGAACCCCCCG CCCACCC (SEQ ID NO: 138)

图17

IgG1 -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53  
 IgG4 ---ESKYGPPCPSCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF 57  
 IgG2 -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51  
 IgG3 EPKSCDTPPPCCRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60

\*\*\*\*\* , \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*

IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113  
 IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117  
 IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111  
 IgG3 KWyVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 173  
 IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 177  
 IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 171  
 IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP 180

\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

IgG1 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225  
 IgG4 PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229  
 IgG2 PMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223  
 IgG3 PMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVHEALHNRFTQKSLSLSPGK 232

\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*

图18

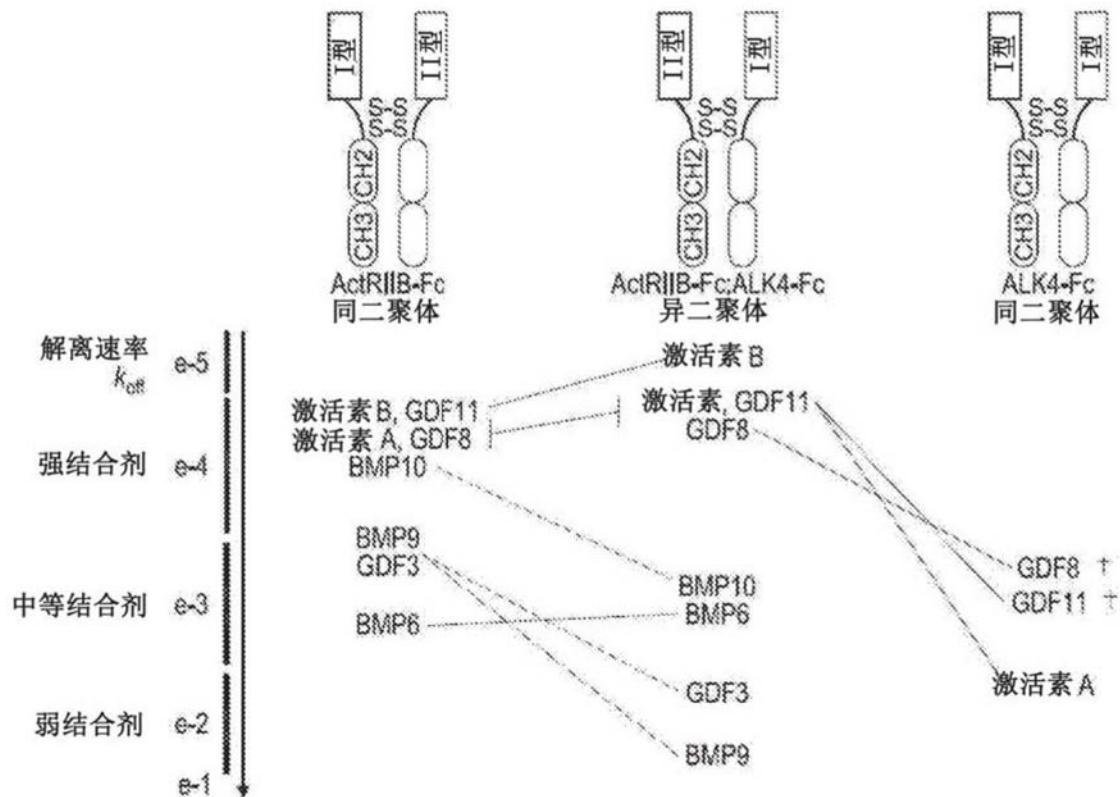


图19

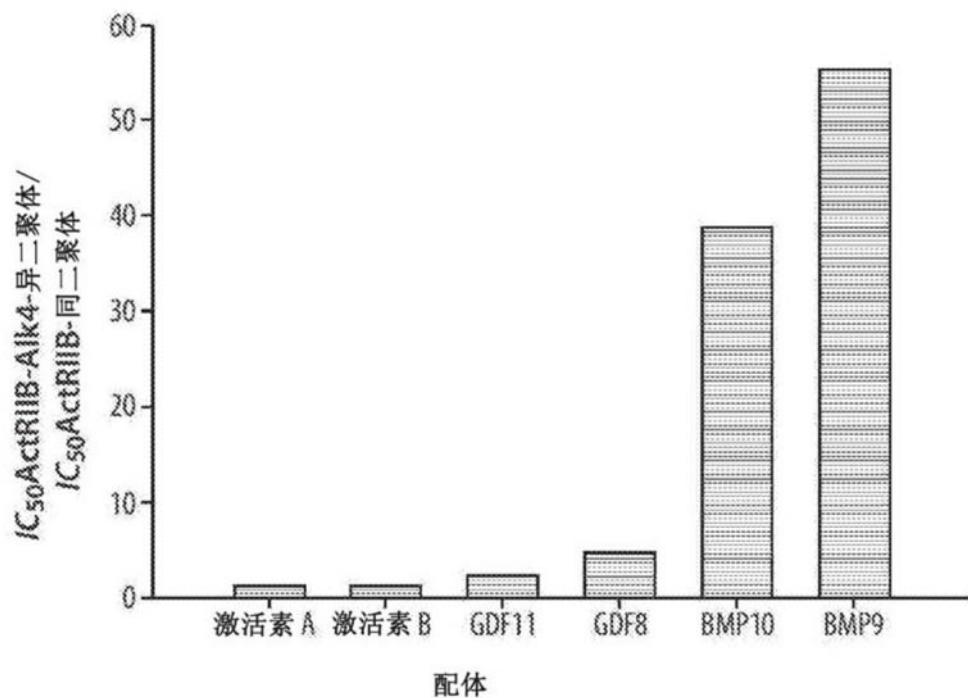


图20

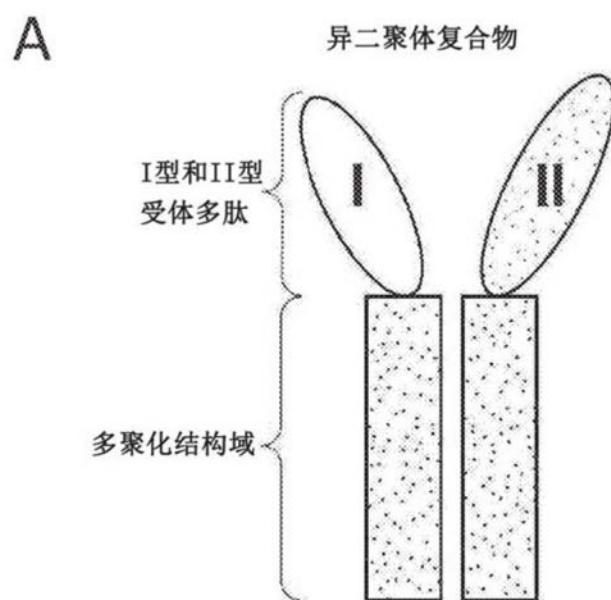


图21A

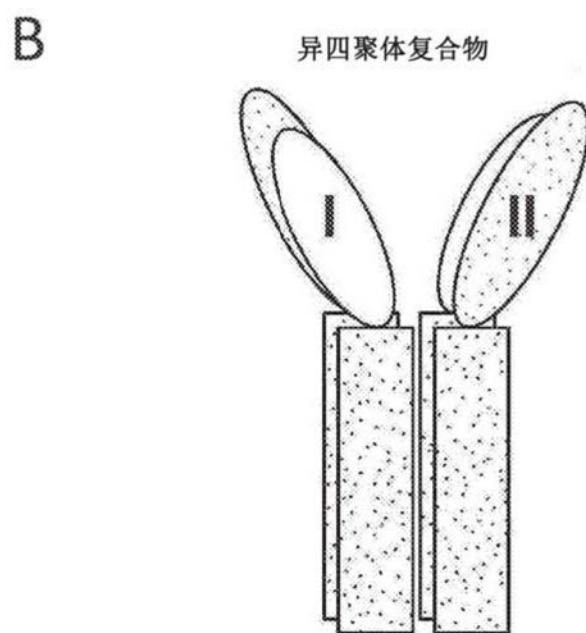


图21B

## 示意性异聚蛋白质复合物

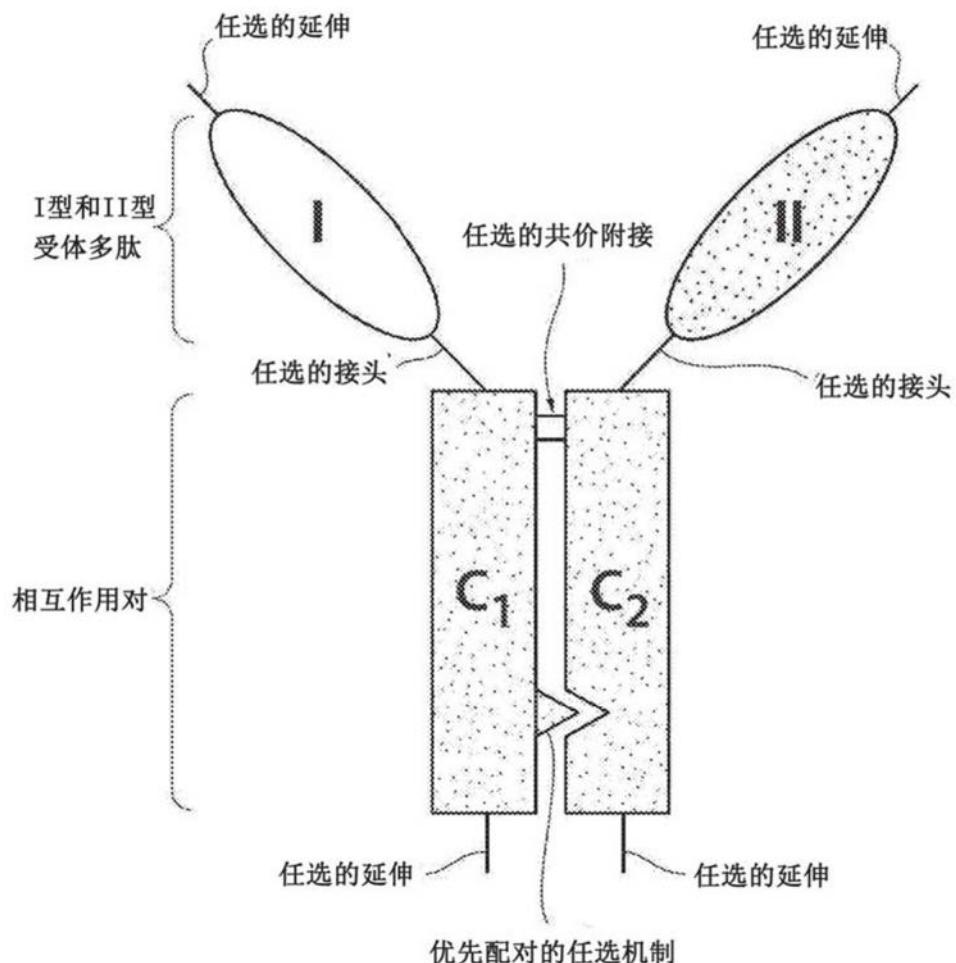


图22

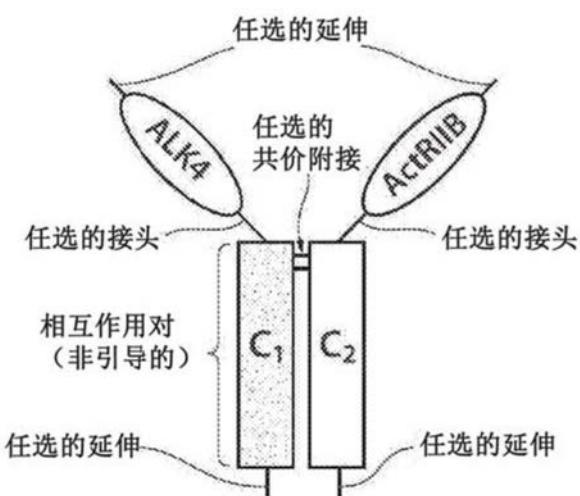


图23A

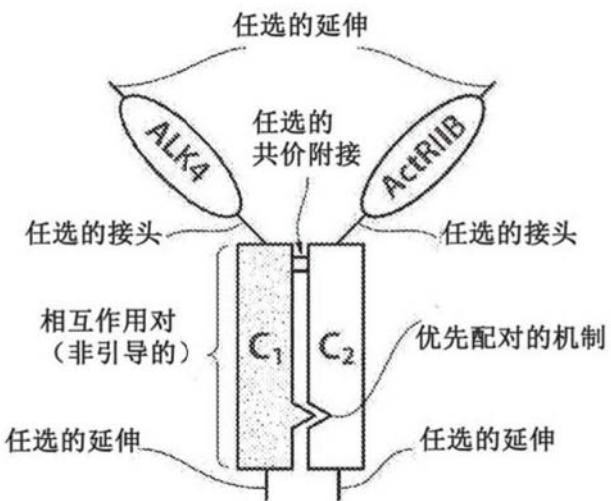


图23B

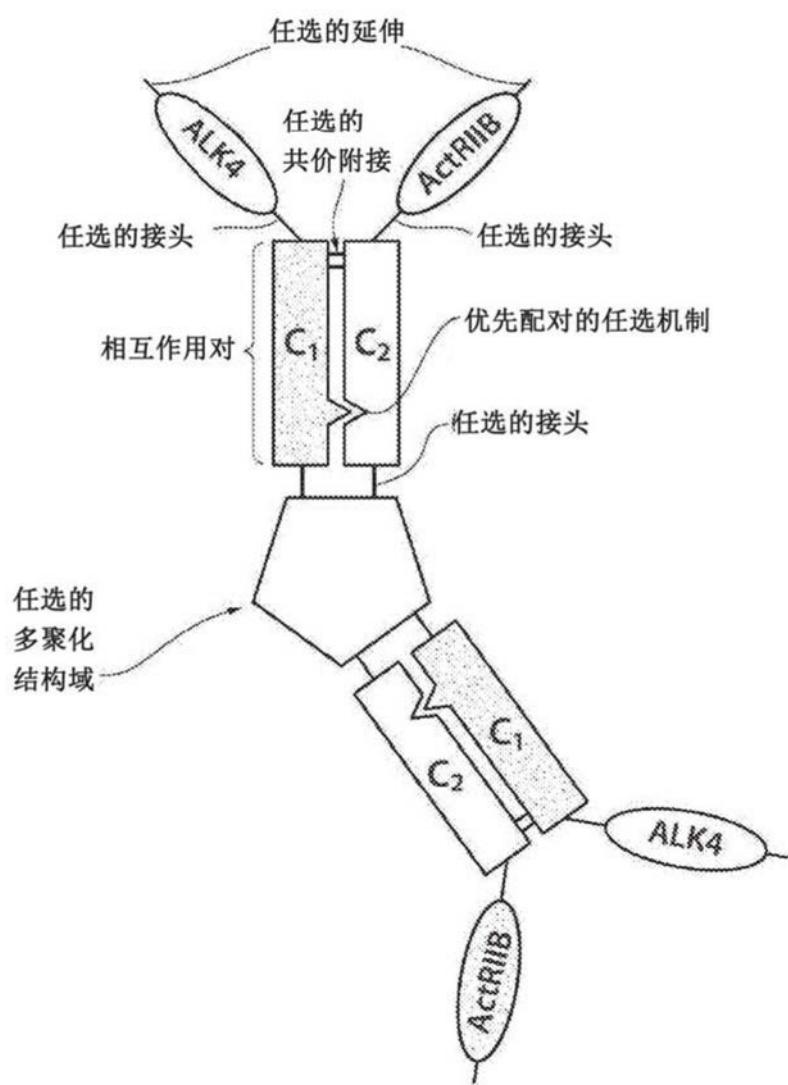


图23C

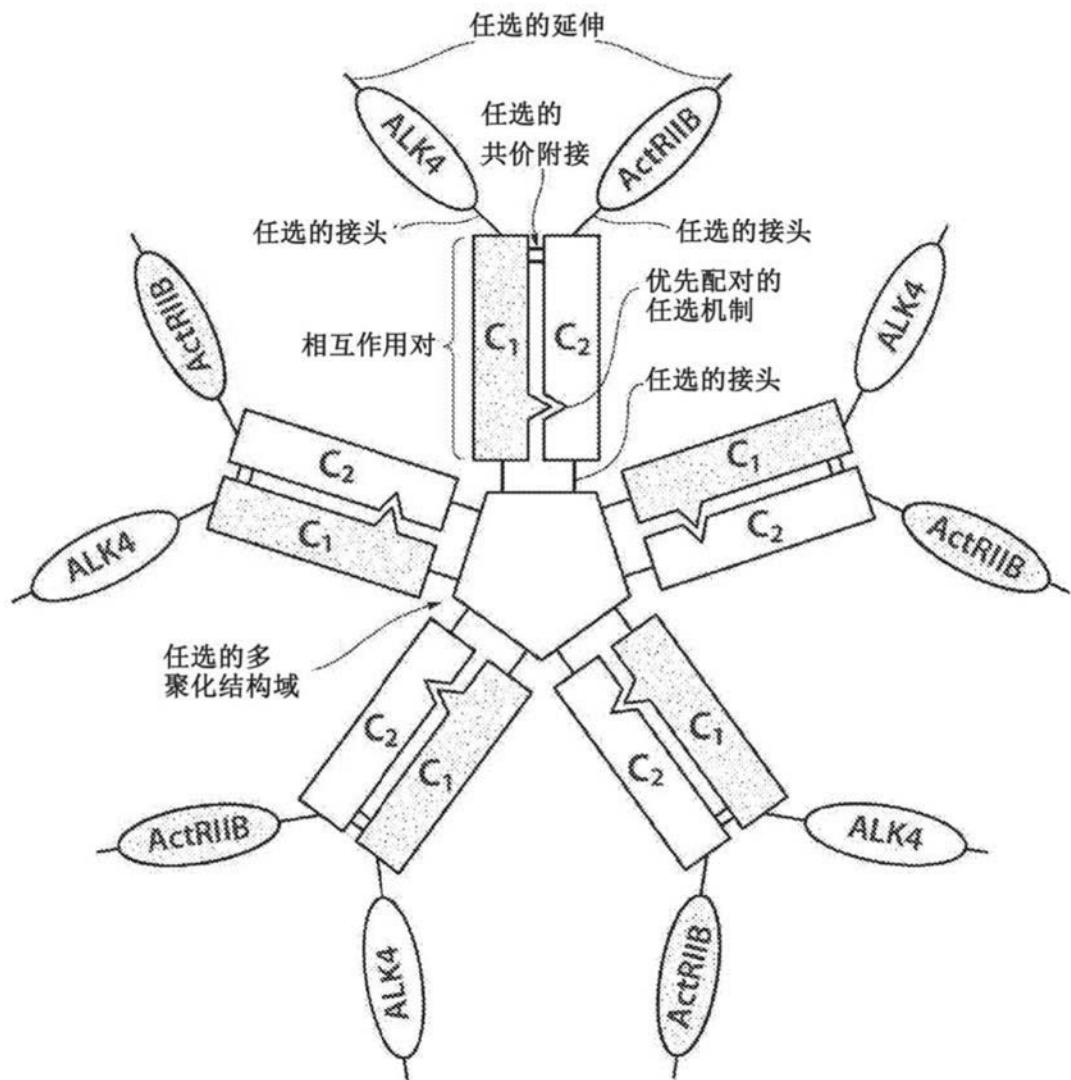


图23D

## 天然前导序列 剪接插入物（25个氨基酸）

	天然前导序列			剪接插入物（25个氨基酸）		
天然TβRII短	1	10	20	30	35	VNNDMIV***
TβRII 短 (23-X)				TIPPHVQKS-	30	VNNDMIV***
TβRII 短 (29-X)				TIPPHVQKS-	35	VNNDMIV***
TβRII 短 (35-X)				QKS-	30	VNNDMIV***
天然TβRII长	1	10	20	30	35	DMIV***
TβRII长 (23-X)				TIPPHVQKS-	30	VNNDMIV***
TβRII长 (29-X)				TIPPHVQKS-	35	VNNDMIV***
TβRII长 (60-X)				QKS-	30	60
				TIPPSCNRTAHPHLRHNNDMIV***	40	50
				TIPPSCNRTAHPHLRHNNDMIV***	50	60
				QKS-	60	60
				DMIV***		

图24