



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103432568 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201310314219. 4

(22) 申请日 2006. 11. 22

(30) 优先权数据

60/739462 2005. 11. 23 US

60/783322 2006. 03. 17 US

60/844855 2006. 09. 15 US

(62) 分案原申请数据

200680051538. 9 2006. 11. 22

(71) 申请人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 J. 克诺普夫 J. 西拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 温宏艳 林森

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

A61P 19/08(2006. 01)

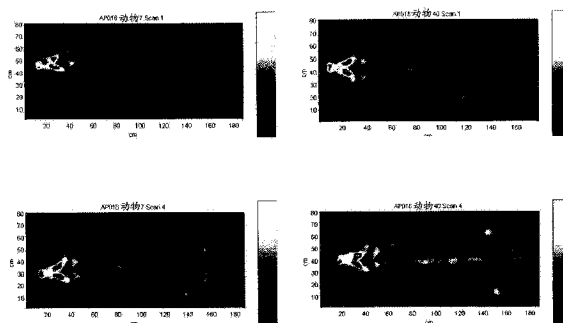
权利要求书1页 说明书31页 附图13页

(54) 发明名称

Activin-ActRIIa 拮抗剂及其促进骨骼生长的应用

(57) 摘要

本申请涉及 Activin-ActRIIa 拮抗剂及其促进骨骼生长的应用。在某些方面,本发明提供了用于促进骨骼生长以及增加骨密度的组合物和方法。



1. 一种可溶性多肽,其包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 95%同一性的氨基酸序列,其中所述多肽的 N-末端是 ILGRSETQE (SEQ ID NO:11),并且其中所述多肽结合 activin A。
2. 权利要求 1 的多肽,其包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 97%同一性的氨基酸序列。
3. 权利要求 2 的多肽,其包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 99%同一性的氨基酸序列。
4. 权利要求 3 的多肽,其包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。
5. 权利要求 1 的多肽,其是 activin A 的拮抗剂。
6. 权利要求 1 的多肽,其在体内促进骨骼生长。
7. 权利要求 6 的多肽,其包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 97%同一性的氨基酸序列。
8. 权利要求 7 的多肽,其包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 99%同一性的氨基酸序列。
9. 权利要求 8 的多肽,其包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。
10. 权利要求 1 的多肽,其具有大于两周的血清半衰期。
11. 权利要求 10 的多肽,其具有在 20 天到 30 天之间的血清半衰期。
12. 权利要求 1 的多肽,其是糖基化的而且具有哺乳动物的糖基化模式。
13. 权利要求 12 的多肽,其具有从中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系获得的糖基化模式。
14. 一种组合物,其包含权利要求 1 的多肽和可药用的载体,其中所述的多肽的纯度至少为 98%,其通过尺寸排阻层析确定的。
15. 权利要求 14 的组合物,其中所述的多肽包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 97%同一性的氨基酸序列。
16. 权利要求 15 的组合物,其中所述的多肽包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 99%同一性的氨基酸序列。
17. 权利要求 16 的组合物,其中所述的多肽包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

Activin-ActRIIa 拮抗剂及其促进骨骼生长的应用

[0001] 本申请是申请号为 200680051538.9、申请日为 2006 年 11 月 22 日的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2005 年 11 月 23 号提交的临时申请号为 60/739,462、2006 年 3 月 17 日提交的临时申请号为 60/783,322、2006 年 9 月 15 号提交的临时申请号为 60/844,855 的优先权权益,上述申请通过参考整体并入本申请。

背景技术

[0004] 骨骼疾病,包括从骨质疏松到骨折,代表了一组病理状态,极少有可以有效针对这些病理状态的药物制剂。取而代之的是,治疗的焦点集中在包括固化、运动和饮食改变物理和行为干涉上。对于治疗各种骨骼疾病,有促进骨骼生长以及增加骨骼密度的治疗药剂将是有益的。

[0005] 骨骼生长和矿化依赖于成骨细胞和破骨细胞这两种类型细胞的活性,尽管软骨细胞和血管细胞也参与了这些过程的关键方面。发展地,骨骼形成通过两种机制发生,软骨内成骨和膜内成骨,前者负责纵行骨形成,后者负责拓扑扁平骨如头骨骨骼的形成。软骨内成骨要求顺序形成以及生长板内的软骨结构的降解,所述的生长板作为成骨细胞、破骨细胞、血管细胞的形成以及随后的矿化的模板。在膜内成骨过程中,骨骼在结缔组织中直接形成。这两种进程要求成骨细胞的浸润和后续的基质沉积。

[0006] 骨折以及其它的骨骼结构性破裂通过一种至少表面上类似骨生成的发育顺序的过程来愈合,所述的骨生成的发育包括软骨组织形成以及随后的矿化。骨折愈合的过程可以以两种方式发生。直接或初始的骨骼愈合的发生没有骨痂形成。间接或二级的骨骼愈合的发生具有骨痂前体阶段。骨折的初期愈合涉及横跨紧密排布破裂的机械连接的改造。在合适的条件下,围绕破裂的骨骼吸收细胞显示了隧道吸收应答,并构建穿刺血管以及随后的愈合的通路。骨骼的二级愈合以炎症反应、软骨痂形成、骨痂矿化和骨痂重构的顺序进行。在炎症反应阶段,水肿和出血形成源于损伤位置的骨膜以及骨内膜血管的破裂。炎性细胞侵入该区域。在软骨痂形成阶段,细胞生成新的血管、成纤维母细胞、胞内物质和支持细胞,在骨折破片间的间隙形成肉芽组织。横跨破裂的临床愈合通过纤维状的或软骨组织(软骨痂)建立。成骨细胞形成并调节软骨痂的矿化,然后所述的软骨痂被板层骨所代替且受限正常的重构过程。

[0007] 除了骨折以及骨骼结构的其他物理破裂外,骨骼矿物质含量以及骨密度的丢失可由多种不同的条件引起并且可能导致重要的医学问题。骨密度的改变以相对可预期的方式发生于个体整个寿命期间。大约到 30 岁的时候,男性和女性的骨骼通过软骨内成骨生长盘的线性生长和径向生长生长至最大质量。在大约 30 岁(对于松质骨,例如,扁平骨诸如椎骨和骨盆)以及 40 岁(对于皮质骨,例如,在肢体中的长骨),男性和女性均发生缓慢的骨丢失。在女性中,还存在最后阶段的实质骨骼丢失,也许是由于绝经后缺乏雌激素。在此期间,女性可能在皮质骨上额外丢失 10% 的质量,以及在松质间隔上额外丢失 25% 的质

量。进行性的骨骼质量丢失是否导致病理状况诸如骨质疏松严重依赖于个体的初始骨骼质量以及是否存在加重的状况。

[0008] 骨丢失有时以正常骨骼重构过程的不平衡为特征。健康的骨骼经常受限于重构。重构以骨骼被破骨细胞吸收开始。然后被吸收的骨骼被新的骨骼组织所代替,其特征成在于成骨细胞形成胶原并且随后钙化。在健康的个体中,吸收和形成的速率是平衡的。骨质疏松症是一种慢性的、进行性的状况,以朝向吸收的转移为标记,导致骨骼质量的全面减少以及骨骼矿化。人体的骨质疏松症先于临床的骨质减少(骨矿物质密度在年轻成年人的均值以下大于一个标准差但小于两个标准差)。世界范围内,大致 7 亿 5 千万人具有骨质疏松的风险。

[0009] 因此,控制破骨细胞和成骨细胞活性的方法对促进骨折和骨骼其它损伤的愈合以及疾病(如骨质疏松,与骨骼质量的损失以及骨骼矿化相关)的治疗是有效的。

[0010] 关于骨质疏松症,雌激素、降钙素、骨钙素和维生素 K,或大剂量的膳食钙均用作干预治疗。其它的骨质疏松的治疗途径包括双磷酸酯、甲状旁腺激素、拟钙剂(calcimimetic)、他汀类、镧和锆的盐以及氟化钠。然而,这些治疗方法通常与不良副作用相关联。

[0011] 因此,本发明的目的是提供促进骨骼生长和矿化的组合物及方法。

发明内容

[0012] 发明概述

[0013] 部分地,本发明证明了具有激活素(activin)或激活素 IIA 型受体(ActRIIa)拮抗剂活性(“activin 拮抗剂”和“ActRIIa 拮抗剂”)的分子能够用于增加骨骼密度,促进骨骼生长,并且/或增加骨骼强度。特别地,本发明证明了 ActRIIa 的可溶形式作为 activin-ActRIIa 信号的抑制剂,并且在体内促进增加的骨骼密度、骨骼生长和骨骼强度。然而,绝大多数的促进骨骼生长或抑制骨骼损失的药物制剂或者作为抗-分解代谢制剂(通常也涉及如“分解代谢制剂”)(如,双磷酸酯)或者作为合成代谢制剂(如,甲状旁腺激素,PTH,当剂量适宜时),可溶性的 ActRIIa 蛋白显示双重活性,具有分解代谢和合成代谢的效果。因此,本发明确立,activin-ActRIIa 信号通路的拮抗剂可以用于增加骨骼密度以及促进骨骼生长。然而可溶性的 ActRIIa 可能通过除了 activin 拮抗以外的机制影响骨骼,尽管如此,本发明证明了合意的治疗剂可以根据 activin-ActRIIa 拮抗剂活性来选择。因此,在某些实施方式中,本发明提供了使用 activin-ActRIIa 拮抗剂的方法来治疗与低骨骼密度或低骨骼强度相关联的疾病(如骨质疏松症)或促进有此需要的患者(如在骨折的患者中)的骨骼生长,所述的 activin-ActRIIa 拮抗剂包括例如激活素结合 IIA 型受体(activin-binding ActRIIa)多肽、抗 activin 抗体、抗 ActRIIa 抗体、activin 靶向或 ActRIIa 靶向的小分子和核酸适体,以及降低 activin 和 ActRIIa 表达的核酸。此外,可溶性的 ActRIIa 多肽促进骨骼生长而不造成肌肉质量的持续可测量的增加。

[0014] 在某些方面,本发明提供了包括可溶的、结合至 activin 的 activin-binding ActRIIa 多肽的多肽。ActRIIa 多肽可以被制成包含 activin-binding ActRIIa 和药学上可接受的载体的药物制剂。优选的,activin-binding ActRIIa 多肽以小于 1 个微摩尔或小于 100、10 或 1 个纳摩尔的 K_D 结合至激活素。视情况,相对于 GDF11 和/或 GDF8,

activin-binding ActRIIa 选择性地结合 activin, 优选地, activin 的 K_D 至少比 GDF11 和 / 或 GDF8 的 K_D 要低 10 倍、20 倍或 50 倍。然而不希望束缚于特定的作用机制, 预期的是, activin 抑制高于 GDF11/GDF8 的选择度说明了在骨骼上的选择效果不会在肌肉上造成持续可测量的效果。在一些实施方式中, 选择引起低于 15%、低于 10% 或低于 5% 的肌肉增长的 ActRIIa 在骨骼上获得合意的效果的剂量。优选地, 组合物的纯度至少是 95%, 有关其它的多肽成分, 通过尺寸排阻色谱确定, 更优选地, 组合物的纯度至少是 98%。这样的制剂中使用的 activin-binding ActRIIa 多肽可以是本发明所公开的任意多肽, 如具有选自 SEQ ID Nos :2、3、7、12 或 13 的氨基酸序列的多肽, 或与选自 SEQ ID Nos :2、3、7 或 12 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 同一性的多肽。Activin-binding ActRIIa 多肽可以包括天然的 ActRIIa 的功能性片段, 如包含选自 SEQ ID Nos :1-3 的序列或 SEQ ID Nos :2 (缺少 C 末端的 10 到 15 个氨基酸) 的序列的至少 10 个、20 个或 30 个氨基酸 (“尾”)。

[0015] 相对于天然存在的 ActRIIa 多肽, 可溶性的、activin-binding ActRIIa 多肽可以包括一个或多个氨基酸序列的改变 (例如在配体结合结构域)。改变了的 ActRIIa 多肽的例子提供在 W02006/012627 的第 59-60 页, 在此以引用的方式并入本文。氨基酸序列的改变可以是, 例如, 当在哺乳动物、昆虫或其它真核细胞生产时改变多肽的糖基化, 或者相对于天然存在的 ActRIIa 多肽改变多肽的蛋白酶切。

[0016] Activin-binding ActRIIa 多肽可以是融合蛋白, 其具有 ActRIIa 多肽的一个结构域 (例如 ActRIIa 多肽的配体结合部分) 和一个或多个另外的提供合意的特性 (如改进的药代动力学、更容易纯化、靶向特定的组织等) 的结构域。例如, 融合蛋白的结构域可以增强体内稳定性、体内半衰期、吸收 / 施用、组织定位或分配、蛋白质复合物的形成、融合蛋白的多聚化和 / 或纯化中的一种或多种。Activin-binding ActRIIa 融合蛋白可以包括免疫球蛋白 Fc 结构域 (野生型或突变体) 或血清白蛋白或其它提供合意特性 (诸如改进的药代动力学、改进的可溶性或改进的稳定性) 的多肽部分。在一个优选的实施方式中, ActRIIa-Fc 融合包括相对非结构化连接子, 其位于 Fc 结构域和 ActRIIa 胞外结构域之间。这种非结构化的列键字可以对应于 ActRIIa 胞外结构域的 C 末端端点 (“尾”) 的大致 15 个氨基酸非结构化区域, 或者其可以是 1、2、3、4 或 5 个氨基酸的人工序列, 或 5 个与 15、20、30、50 个或更多个二级结构相对自由的氨基酸间的长度, 或两者的混合物。连接子可以是富含甘氨酸和脯氨酸残基的, 并且可以, 例如, 含有苏氨酸 / 丝氨酸和甘氨酸的简单序列或苏氨酸 / 丝氨酸和甘氨酸的重复序列 (例如, TG_4 或 SG_4 单态或重复序列)。融合蛋白可以包括纯化的子序列, 如表位标签、FLAG 标签、多聚组氨酸序列以及 GST 融合。视情况, 可溶性的激活素结合 IIA 型受体多肽包括一个或多个选自下组的修饰的氨基酸残基: 糖基化的氨基酸、聚乙二醇修饰的 (PEGylated) 氨基酸、法尼基化 (farnesylated) 的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、耦联脂质体部分的氨基酸、耦联有机衍生物制剂的氨基酸。药物制剂也可以包括一个或多个附加化合物诸如用于治疗骨骼疾病的化合物。优选地, 药物制剂大体上是无致热源的。一般地, 优选的是 ActRIIa 蛋白在哺乳动物细胞系中表达, 所述的细胞系调节 ActRIIa 蛋白合适地天然糖基化以消除患者的不良免疫反应的可能性。人细胞系以及 CHO 细胞系已被成功地应用, 并且预期其它普通的哺乳动物表达系统也是有用的。

[0017] 如本发明所描述的, ActRIIa 蛋白指定的 ActRIIa-Fc 具有合意的特性, 包括相对

于 GDF8 和 / 或 GDF11 选择性地结合激活素, 配体结合的高亲和性以及动物模型中大于两周的血清半衰期。在某些实施方案中, 本发明提供了 ActRIIa-Fc 多肽以及包含这样的多肽和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。

[0018] 在某些方面, 本发明提供了编码可溶性 activin-binding ActRIIa 多肽的核酸。分离的多核苷酸可以包含诸如上面所描述的可溶性 activin-binding ActRIIa 多肽的编码序列。例如, 分离的核酸可以包括 ActRIIa 的胞外结构域 (例如, 配体结合结构域) 的编码序列, 以及编码部分或全部的跨膜结构域和 / 或 ActRIIa 的胞浆结构域的序列, 但不编码位于跨膜结构域中或胞浆结构域中的或位于胞外结构域与跨膜结构域或胞浆结构域之间的终止密码子。例如, 分离的多核苷酸可以包含全长 ActRIIa 多核苷酸序列诸如 SEQ ID NO : 4 或 5, 或部分截除的序列, 所述的多核苷酸进一步包含在 3' 末端之前至少 600 个核苷酸或其它的使得多核苷酸的翻译导致胞外结构域随机地融合到部分截短的全长 ActRIIa 的位置的转录终止密码子。优选的核酸序列是 SEQ ID NO : 14。本发明所公开的核酸可操作地连接到用于表达的启动子, 并且本发明提供了转化了这样的重组多核苷酸的细胞。优选地, 所述的细胞是哺乳动物细胞, 诸如 CHO 细胞。

[0019] 在某些方面, 本发明提供了制备可溶性 activin-binding ActRIIa 多肽的方法。这样的方法可包括在适宜的细胞 (诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞) 中表达本发明所公开的任何核酸 (例如, SEQ ID NO : 4、5 或 14)。这样的方法可包括 : a) 在适宜的条件下培养细胞以表达可溶性的 ActRIIa 多肽, 其中所述的细胞转化有可溶性 ActRIIa 的表达构建物 ; 以及 b) 复性所表达的可溶性 ActRIIa 多肽。可溶性 ActRIIa 多肽可以作为天然的、部分纯化的或高度纯化的片段复性。纯化可以通过一系列的纯化步骤完成, 包括例如, 下面所述中的一个、两个或三个或多个, 以任意的顺序 : 蛋白亲和层析 (protein A chromatography)、阴离子交换层析 (例如, Q 琼脂糖)、疏水层析 (例如, 苯基琼脂糖), 尺寸排阻层析和阳离子交换层析。

[0020] 在某些方面, 本发明所公开的 activin-ActRIIa 拮抗剂, 诸如可溶性的 activin-binding ActRIIa 多肽, 可以用于一种以促进骨骼生长或增加骨骼密度为目的的方法。在某些实施方式中, 本发明提供了治疗低骨骼密度相关疾病或在有此需求的患者中促进骨骼生长的方法。该方法可以包含对此需求的对象施用有效剂量的 activin-ActRIIa 拮抗剂。在某些方面, 本发明提供了使用 activin-ActRIIa 拮抗剂制备治疗上面所述的疾病或状况的药物。

[0021] 在某些方面, 本发明提供了鉴别刺激骨骼生长或增加骨骼矿化的药物的方法。所述的方法包括 : a) 鉴别结合至 activin 或 ActRIIa 多肽的配体结合结构域的待测药物 1 ; b) 评估药物在骨骼生长或矿化上的效果。

附图说明

[0022] 图 1 显示了 CHO 细胞中所表达的 ActRIIa-hFc 的纯化。纯化的蛋白为一个良好峰形的单峰。

[0023] 图 2 显示了 ActRIIa-hFc 结合至 activin 和 GDF11, 通过 BiaCore 分析检测。

[0024] 图 3 显示了 A-204 报告基因分析的示意图。该图显示了报告载体 : pGL3 (CAGA) 12 (在 EMB017 : 3091-3100 中有描述, Dennler 等, 1998)。CAGA12 基序出现在

TGF- β 反应性基因 (PAI-1 基因) 中, 因此该载体通常用于通过 Smad2 和 3 信号通路的因子。

[0025] 图 4 显示了 A-204 报告基因分析中 ActRIIa-hFc (菱形) 和 ActRIIa-mFc (方块) 在 GDF-8 信号上的效果。两种蛋白都展示了其在皮摩尔浓度几乎完全抑制 GDF-8 调节的信号。

[0026] 图 5 显示了 A-204 报告基因分析中三种不同的 ActRIIa-hFc 制剂在 GDF-11 信号上的效果。

[0027] 图 6 显示了对照组和 ActRIIa-mFc 处理的 BALB/c 小鼠在 12 周的治疗期前 (上面) 和后 (下面) 的 DEXA (双能 X 线吸收测定) 图像的示例。浅色部分显示了增加了的骨骼密度。

[0028] 图 7 显示了 ActRIIa-mFc 在 BALB/c 小鼠 12 周治疗期间对骨矿密度的效果的定量。治疗分为对照 (菱形)、2mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (方块)、6mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (三角形) 以及 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (圆圈)。

[0029] 图 8 显示了 ActRIIa-mFc 在 BALB/c 小鼠 12 周治疗期间对骨矿含量的效果的定量。治疗分为对照 (菱形)、2mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (方块)、6mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (三角形) 以及 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (圆圈)。

[0030] 图 9 显示了 ActRIIa-mFc 对摘除卵巢 (OVX) 或假手术 6 周以上的 C57BL6 小鼠松质骨骨矿密度的效果的定量。治疗分为对照 (PBS) 或 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (ActRIIa)。

[0031] 图 10 显示了 ActRIIa-mFc 在摘除卵巢的 (OVX) C57BL6 小鼠的 12 周治疗期间对松质骨的效果的定量。治疗分为对照 (PBS, 浅色条) 或 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (ActRIIa, 深色条)。

[0032] 图 11 显示了 ActRIIa-mFc 在假手术的 C57BL6 小鼠 6 周或 12 周治疗期后对松质骨的效果的定量。治疗分为对照 (PBS, 浅色条) 或 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (ActRIIa, 深色条)。

[0033] 图 12 显示了摘除卵巢的 (OVX) 小鼠的 12 周治疗期间的骨骼密度 pQCT 分析结果。治疗分为对照 (PBS, 浅色条) 或 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (ActRIIa, 深色条)。Y 轴: mg/ccm

[0034] 图 13 描述了假手术的小鼠 12 周治疗期间的骨骼密度 pQCT 分析结果。治疗分为对照 (PBS, 浅色条) 或 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-mFc (ActRIIa, 深色条)。Y 轴: mg/ccm

[0035] 图 14A 和图 14B 显示了 12 周治疗期后 (A) 的全身 DEXA 分析和股骨间接体内分析 (B)。亮区描述了高骨骼密度的区域。

[0036] 图 15 显示了 12 周治疗期后的股骨中段的间接体内 pQCT 分析。治疗分为对照 (PBS, 深色条) 和 ActRIIa-mFc (浅色条)。左侧的四个条显示总骨骼密度而右侧的四个条显示皮质骨密度。每四个条的第一对代表了源于摘除卵巢的小鼠的数据而第二对代表了源于假手术小鼠的数据。

[0037] 图 16 显示了 12 周治疗期后的股骨中段的间接体内 pQCT 分析和骨干含量。治疗分为载体对照 (PBS, 深色条) 或 ActRIIa-mFc (浅色条)。左侧的四个条显示总骨骼含量而右侧四个条显示皮质骨含量。每四个条的第一对代表了源于摘除卵巢的小鼠的数据而第二对代表了源于假手术小鼠的数据。

[0038] 图 17 显示了股骨中段的间接体内 pQCT 分析和股骨皮层厚度。治疗分为对照 (PBS, 深色条) 或 ActRIIa-mFc (浅色条)。左侧的四个条显示骨内膜周长而右侧的四个条小时骨膜周长。每四个条的第一对代表了源于摘除卵巢的小鼠的数据而第二对代表了源于假手术小鼠的数据。

[0039] 图 18 描述了 12 周治疗期后的股骨力学检测结果。治疗分为对照 (PBS, 深色条) 或 ActRIIa-mFc (浅色条)。左侧的两个条代表了源于摘除卵巢的小鼠的数据而后面的两个条代表了源于假手术小鼠的数据。

[0040] 图 19 显示了 ActRIIa-mFc 对松质骨容积的影响。

[0041] 图 20 显示了 ActRIIa-mFc 对股骨远端的松质骨结构的影响。

[0042] 图 21 显示了 ActRIIa-mFc 对皮质骨的影响。

[0043] 图 22 显示了 ActRIIa-mFc 对骨骼力学强度的影响。

[0044] 图 23 显示了在三个不同剂量下, 不同剂量的 ActRIIa-mFc 对骨骼特性的影响。

[0045] 图 24 显示了组织形态学测量 (histomorphometry) 表明 ActRIIa-mFc 具有双重的合成代谢和抗吸收活性。

[0046] 发明详述

[0047] 1. 综述

[0048] 转化生长因子 beta (TGF-beta) 超家族包含多种具有相同的共有序列单元以及结构基序的生长因子。已知这些蛋白对脊椎动物和无脊椎动物的许多类型的细胞发挥生物学功能。超家族的成员在胚胎发育期的模式形成以及组织分化中执行重要功能, 并且能影响多种分化进程, 包括脂肪生成、肌肉发生、软骨形成、心脏发生、造血作用、神经生成以及上皮细胞分化。这个家族被分为两个通用分支: BMP/GDF 和 TGF-beta/Activin/BMP10 分支, 其成员具有不同的、通常是互补的效果。通过操纵 TGF-beta 家族成员的活性, 通常可以导致生物体内重要的生理学变化。例如, 皮德蒙特 (Piedmontese) 和比利时蓝 (Belgian Blue) 牛品种带有 GDF8 (也叫做肌抑素 (myostatin)) 基因内的缺失功能的突变, 其导致肌肉质量的显著增长。Grobet 等, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4。此外, 在人体, GDF8 等位基因的失活与肌肉质量的增加以及 (据称) 异常强度相关。Schuelke 等, N Engl J Med 2004, 350:2682-8。

[0049] 激活素 (activin) 是属于 TGF-beta 超家族的二聚体多肽生长因子。有三种基本形式 (A、B 和 AB) 的 activin, 其为两个密切相关的 β 亚单位 ($\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$) 的同源 / 异源二聚体。人类基因组也编码 activin C 和 activin E, 其最初在肝脏中表达。在 TGF-beta 超家族中, activins 是可以刺激卵巢内以及胎盘细胞中激素产生、支持神经细胞存活、依赖细胞类型正性或负性地影响细胞周期进程、以及至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层分化的惟一的以及多功能的因子 (DePaolo 等, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson 等, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963)。此外, 分离自刺激过的人单核细胞白血病细胞的红细胞分化因子 (EDF) 被发现与 activin A 相同 (Murata 等, 1988, PNAS, 85:2434)。已经表明 activin A 在骨髓腔中作为红细胞生成的天然的正调节因子。在一些组织中, activin 信号被其相关的异二聚体、抑制素所拮抗。例如, 在垂体释放卵泡刺激素 (FSH) 时, activin 促进 FSH 分泌与合成, 而抑制素阻止 FSH 分泌与合成。其它的可调节 activin 生物活性和 / 或结合至 activin 的蛋白

包括卵泡抑制素 (FS)、卵泡抑制素相关蛋白 (FSRP)、 α_2 -巨球蛋白、Cerberus 和内皮糖蛋白 (endoglin)。

[0050] TGF- β 信号通过 I 型和 II 型丝氨酸 / 苏氨酸激酶受体的异聚复合体调节,其通过配体激活而磷酸化以及激活下游的 Smad 蛋白 (Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178)。这些 I 型和 II 型受体是跨膜蛋白,由带有富含半胱氨酸区域的配体结合胞外结构域、跨膜结构域和带有预知的丝氨酸 / 苏氨酸特异性的细胞质结构域组成。I 型是信号通路所必须的;II 型是结合配体以及表达 I 型受体所需的。I 型和 II 型 activin 受体在配体结合后形成稳定的复合物,导致 I 型受体被 II 型受体磷酸化。

[0051] 两种相关的 II 型受体, ActRIIa 和 ActRIIb, 已被鉴定为 activin 的 II 型受体 (Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano 等, 1992, Cell 68:97-108)。除 activin 外, ActRIIa 和 ActRIIb 可以生化地与其它几种 TGF- β 家族蛋白相互作用, 包括 BMP7、Nodal、GDF8 和 GDF11 (Yamashita 等, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee 和 McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo 和 Whitman, 2001, Mol. Cell 17:949-957; Oh 等, 2002, Genes Dev. 16:2749-54)。ALK4 是主要的 activin I 型受体, 特别是对 activin A 而言, 并且 ALK-7 也可以作为 activins 的受体, 特别是对 activin B。

[0052] 如本发明所证明的, 可溶性的 ActRIIa 多肽 (sActRIIa), 其显示了相对于其它的 TGF-beta 家族成员诸如 GDF8 或 GDF11 基本上优先选择结合至 activin A, 可在体内有效地促进骨骼生长以及增加骨骼密度。然而不希望受限于任何特定的机制, 考虑到通过这些研究中所采用的特定 sActRIIa 构建物所展现的 activin 非常强的结合 (皮摩尔解离常数), 期望 sActRIIa 的效果主要是由 activin 拮抗剂效果所引起的。不考虑机制, 这里的数据很明显地表明, ActRIIa-activin 拮抗剂确实在正常小鼠以及骨质疏松的小鼠模型中增加了骨骼密度。请注意骨骼是动态组织, 其生长或萎缩以及密度的增加或减少依赖于生产骨骼以及刺激矿化 (主要是成骨细胞) 的因素与破坏以及去除骨骼矿物质 (主要是破骨细胞) 的因素之间的平衡。骨骼的生长和矿化可以通过增加生产性因素或减少破坏性因素或两者同时进行而增加。术语“促进骨骼生长”和“增加骨骼矿化”指的是骨骼的物理学可见的变化并且用来中性地描述骨骼中变化发生的机制。

[0053] 本发明所描述的研究中采用的骨质疏松的小鼠模型以及骨骼生长 / 密度被认为在人体中是高度预测具有效果的, 因而, 本发明提供了采用 ActRIIa 多肽以及其它的 activin-ActRIIa 拮抗剂来在人体中促进骨骼生长和提高骨骼密度。Activin-ActRIIa 拮抗剂包括, 例如, activin 结合可溶性 ActRIIa 多肽、结合至 activin (特别是 activin A 或 B 亚单位, 也指代 β A 或 β B) 并且中断 ActRIIa 结合的抗体、结合至 ActRIIa 并且中断 activin 结合的抗体、选自 activin 或 ActRIIa 结合的非抗体蛋白 (参见例如, WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US2003/0133939, 以及 US2005/0238646 中的这类蛋白的例子以及设计和选择相同蛋白的方法)、选自 activin 或 ActRIIa 结合的通常缀合到 Fc 结构域的随机肽。两种具有 activin 或 ActRIIa 结合活性的不同的蛋白 (或其它部分), 特别是分别地阻断 I 型 (例如, 可溶性 I 型 activin 受体) 或 II 型 (例如可溶性 II 型 activin 受体) 结合位点的 activin 结合子, 可以连接起来以产生双功能性结合的分子。核酸适体、小分子和其它的抑制 activin-ActRIIa 信号轴的制剂。各种各样的蛋白具有 activin-ActRIIa 拮抗剂活性, 包括抑制素 (即抑制素 α 亚单元) (尽管

抑制素并不在所有组织中均拮抗 activin)、卵泡抑制素 (如卵泡抑制素 288 和卵泡抑制素 315)、Cerberus、卵泡抑制素相关蛋白 (FSRP)、内皮糖蛋白 (endoglin)、activin C、 α_2 - 巨球蛋白和 M108A (在 108 位由甲硫氨酸变为丙氨酸) 突变 activin A。通常地, activin 的替代形式, 特别是那些在 I 型受体结合结构域有变化的, 可以结合至 II 型受体并且不能形成活性的三重复合物, 因而作为拮抗剂作用。另外, 核酸, 诸如反义分子, 抑制 activinA、B、C 或 E 或 (特别地) ActRIIa 表达的 siRNA 或核酶, 可以用作 activin-ActRIIa 拮抗剂。优选地, 所采用的 activin-ActRIIa 拮抗剂将显示相对于 TGF-beta 家族的其他成员 (相对于 GDF8 和 GDF11) 的抑制 activin 所调节信号的选择性。可溶性的 ActRIIb 结合至 activin, 然而, 野生型的蛋白并不显示相对于 GDF8/11 的结合至 activin 的显著的选择性, 并且初步实验显示, 这种不能提供合意的对骨骼的效果, 但仍能引起肌肉的显著生长。然而, 具有不同的结合特性的 ActRIIb 的改变形式已被鉴定 (参见例如, W02006/012627, 第 55-59 页, 通过引用的方式并入本发明), 并且这些蛋白可以骨骼上的合意的效果。天然的或改变的 ActRIIb 可以通过耦联第二 activin 选择性结合成分而提供对 activin 的附加的特异性。

[0054] 说明书所用的术语在本发明的上下文以及每个术语所应用的特定语境中通常具有其在本领域的普通含义。某些术语在下文中或在说明书的其它部分被讨论, 用以在描述本发明的组合物和方法以及怎样应用上提供给实践者附加的指导。术语的任何应用的范围或含义在其所应用的特定语境中是清楚的。

[0055] “大约”和“接近”通常意味着考虑测量法的本性和精度时实物量度的可接受的错误程度。典型地, 示范性的错误程度在给定数值或数值范围的 20% 以内, 优选在 10% 以内, 更优选地在 5% 以内。

[0056] 或者, 特定地在生物学系统中, 术语“大约”以及“接近”可能意味着一定数量级内的值, 优选的是给定数值 5 倍以内的, 更优选的是 2 倍以内的。除非另有说明, 本发明给定的数值是接近的, 意味着当没有明文规定时, 术语“大约”或“接近”可以推断。

[0057] 本发明的方法可以包括互相对比序列的步骤, 包括野生型的序列与一个或多个突变体 (序列变体) 比较。这样的比较通常包括多聚物序列的比对, 例如, 采用本领域公知的序列比对程序何 / 或运算法则 (例如, BLAST、FASTA 和 MEGALIGN, 可说出一些)。本领域技术人员容易意识到, 在这样的比对中, 在一个包含插入或删除残基的突变中, 比对序列将在不包含插入的或删除的残基的多聚物序列中产生“间隙” (gap) (通常以破折号或“A”表示)。

[0058] “同源的”, 其所有的语法形式和拼写变体, 指的是具有“共同进化起源”的两种蛋白之间的关系, 包括来自同种生物体的超家族的蛋白, 以及来自不同种的生物体的同源蛋白。这样的蛋白 (及其编码核酸) 具有同源的序列, 如由它们的序列相似性反映的, 无论从一致性百分比方面或通过特定残基或基序以及保守位点的存在。

[0059] 术语“序列相似性”, 其所有的语法形式, 指的是一致性的程度或可能或不可能具有共同进化起源的核酸或氨基酸序列间的对应。

[0060] 然而, 在常见用法和即时申请中, 术语“同源”, 当被诸如“高度”这样的副词修饰时, 可指代序列相似性, 并且可能或不可能指代涉及共同进化起源。

[0061] 2. ActRIIa 多肽

[0062] 在某些方面, 本发明涉及 ActRIIa 多肽。如本发明所应用的, 术语“ActRIIa”指的

是来自任何种属以及源于通过突变或其它修饰的 ActRIIa 蛋白变体的激活素 IIa 型受体家族。本发明的 ActRIIa 可以理解为由任何现有的鉴别了的形式。ActRIIa 家族的成员通常是跨膜蛋白,其由具有富含半胱氨酸区域的配体结合胞外结构域、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。

[0063] 术语“ActRIIa 多肽”包括包含有任何天然存在的 ActRIIa 家族成员及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合子和拟肽形式)。例如,ActRIIa 多肽包括来源于任何至少与 ActRIIa 多肽具有大约 80%一致性的已知 ActRIIa 的序列的多肽,优选地至少 85%、90%、95%、97%、99%或更高一致性。例如,本发明的 ActRIIa 多肽可以结合至 ActRIIa 蛋白和 / 或 activin 并抑制其功能。优选地,ActRIIa 多肽促进骨骼生长和骨矿化。ActRIIa 多肽的例子包括人 ActRIIa 前体多肽 (SEQ ID NO :1) 以及可溶性的人 ActRIIa 多肽 (例如,SEQ ID NOs :2、3、7 和 12)。

[0064] 人 ActRIIa 前体多肽序列如下:

[0065] MGAA'AKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRT N
QTGVEPCYGDKDKRRHCFATWK NISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM EVTQPTSNPVT PKPPYYNILLVSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLL
EVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEK
GSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLA YLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGALALKE
AGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDM

[0066] YAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEDMQE

[0067] VVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAG CVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVV
TMVTNVDFPPKESSL (SEQ ID NO :1)

[0068] 信号肽是以单下划线标示的;胞外结构域以粗体标示,并且潜在的 N-连接糖基化位点以双下划线标示。

[0069] 人 ActRIIa 可溶性的(胞外)、加工的多肽序列如下:

[0070] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM EVTQPTSNPVT PKPP (SEQ ID NO :2)

[0071] 胞外结构域的 C-末端“尾”以下划线标示。删除了“尾”(Δ15 序列)的序列如下:

[0072] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO :3)

[0073] 编码人 ActRIIa 前体多肽蛋白的核酸序列如下 (Genbank 登入号 _001616 的 164-1705 位核苷酸):

[0074] ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTT

[0075] CAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTCTTTAATGC

[0076] TAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTTGAACCGTGTTATGGT

[0077] GACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTT

[0078] CCATTGAAATAGTGA' A' ACAAGGTTGTTGGCTGGATGAT' ATCAACTGCTATGA

[0079] CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTTC

[0080] TGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAA' AGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAG

[0081] TCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTAC' ACCTA' AGCCACCCCT' ATTACAACAT
[0082] CCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGT
[0083] GCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTC
[0084] CAACTCAAGACCCAGGACCACCCCACTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACC
[0085] ACTGC' AGTTATTAGAAGTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGAAAA
[0086] GCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACA
[0087] AACAGTCATGGCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCA
[0088] TGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTTGAT
[0089] GTGGATCTTTGGCTGATCAC' AGCATTTTCATGAAA' AGGGTTC' ACTATCAGACT
[0090] TTCTTAAGGCTA' ATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAAC
[0091] CATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAAGAT
[0092] GGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAAGTAAAAATGTGCTGT
[0093] TGAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTGGCCTTAAAAAT
[0094] TGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGGTGGTACCCGGAGG
[0095] TACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATAAACTTCCAAAGGGATGCAT
[0096] TTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGGAACCTGGCTTC
[0097] TCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAG
[0098] GAGG' AAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGC
[0099] ATAAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAAT
[0100] GGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGA' AGCC
[0101] AGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAA
[0102] CAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAA
[0103] TGTTGACTTTTCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO :4)
[0104] 编码人 ActRIIa 可溶性 (胞外) 多肽的核酸序列如下:
[0105] ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGG
[0106] AAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTTGAACCGTGTATGGTGACAAAAGA
[0107] TAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAA
[0108] ATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTG
[0109] ATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGG
[0110] CAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAG CCCACTTCAAATCCAG
TTACACcTAAGCCACCC (SEQ ID NO :5)

[0111] 在特定的实施方式中,本发明涉及可溶性的 ActRIIa 多肽。如本发明所描述的,术语“可溶性 ActRIIa 多肽”通常指代包含 ActRIIa 蛋白的胞外结构域的多肽。这里所用的术语“可溶性 ActRIIa 多肽”包括任何 ActRIIa 蛋白的天然存在的胞外结构域及其任意变体 (包括突变体、片段和拟肽形式)。Activin- 结合 ActRIIa 多肽是保留结合至 activin-、特别是 activinAA、AB 或 BB 的能力的多肽。优选地,activin- 结合 ActRIIa 多肽以 1nM 或更低的解离常数结合至 activinAA。人 ActRIIa 前体蛋白的氨基酸序列提供在下面。ActRIIa 蛋白的结合至 activin 并且通常是可溶的,并因而称为可溶性的 activin- 结合 ActRIIa 多肽。可溶性的 activin- 结合 ActRIIa 多肽的例子包括如 SEQ ID NOs :2、3、7、12 和 13 所说

明的可溶性多肽。SEQ ID NO :7 指代 ActRIIa-hFc,并在实施例中进行进一步描述。其它的可溶性的 activin- 结合 ActRIIa 多肽包括除 ActRIIa 蛋白的胞外结构域外加上一个信号序列,例如,蜜蜂蜂毒肽前导序列 (SEQ ID NO :8),组织纤溶酶原激活剂 (TPA) 前导 (SEQ ID NO :9) 或者天然的 ActRIIa 前导 (SEQ ID NO :10)。在 SEQ ID NO :13 中说明的 ActRIIa-hFc 多肽作为 TPA 前导应用。

[0112] ActRIIa 多肽的功能活性片段可以通过筛选由编码 ActRIIa 多肽的相应核酸片段所产生的多肽而获得。另外,片段可以通过使用公知的在技术诸如传统的 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化学来化学合成。片段可以被生产 (重组地或化学合成) 并用于测试鉴别那些能行使 ActRIIa 蛋白拮抗剂 (抑制剂) 功能的或被 activin 调节信号的肽酰片段。

[0113] ActRIIa 多肽的功能活性的变体可以通过筛选编码 ActRIIa 多肽的相应的诱变处理核酸所产生的修饰的重组多肽的文库而获得。变体可以被生产并用于测试鉴别那些能行使 ActRIIa 蛋白拮抗剂功能的或被 activin 调节信号的。在某些实施方式中,ActRIIa 多肽的功能性变体包括与选自 SEQ ID NOs :2 或 3 的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。在某些例子中,功能性变体具有与选自 SEQ ID NOs :2 或 3 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

[0114] 功能性的变体可以通过为了诸如增强治疗功效或稳定性 (例如,间接体内保质期以及体内的抗蛋白降解的能力) 的目的修饰 ActRIIa 多肽的结构而生成,这样的修饰过的 ActRIIa 多肽当被选择保留 activin 结合时,被认为是天然存在的 ActRIIa 多肽的功能性等同物。修饰的 ActRIIa 多肽也可以生产,例如,通过氨基酸替代、删除或添加。例如,可以合理地预期以异亮氨酸或缬氨酸单独替代亮氨酸、以谷氨酸单独替代天冬氨酸、以丝氨酸单独替代苏氨酸、或者以结构相关的氨基酸替代另一个氨基酸 (例如,保守突变) 不会对所产生的分子的生物学活性带来大的影响。保守替换是那些在家族内的侧链相关的氨基酸之间发生的替换。ActRIIa 多肽氨基酸序列的改变的结果是否为功能同源容易通过评估 ActRIIa 多肽变体以类似于野生型的 ActRIIa 多肽的方式在细胞内产生应答的能力来确定。

[0115] 在某些实施方式中,本发明涵盖了 ActRIIa 多肽的特定突变以便改变多肽的糖基化。这样的突变可以选择以便引入或消除一个或多个糖基化位点, O- 连接或 N- 连接糖基化位点。天冬酰胺 - 连接的糖基化识别位点通常包括三肽序列,天冬酰胺 -X- 苏氨酸 (或天冬酰胺 -X- 丝氨酸) (这里的 X 可以是任何氨基酸),其被适当的细胞糖基化酶特异地识别。改造也可以通过一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加或替代至野生型的 ActRIIa 多肽 (对于 O- 连接的糖基化位点) 而进行。在糖基化识别位点的第一个或第三个氨基酸位点的之一或两者同时的各种氨基酸替换或删除 (和 / 或在第二个位点氨基酸删除) 导致在修饰的三肽序列的非糖基化。另一在 ActRIIa 多肽上增加碳水化合物数目的方法可以通过化学耦合或酶耦合糖苷至 ActRIIa 多肽。依赖于所采用的耦合模式,糖可以被附加至 (a) 精氨酸和组氨酸; (b) 自由羧基; (c) 自由巯基诸如半胱氨酸的自由巯基; (d) 自由羟基诸如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的自由羟基; (e) 芳香残基诸如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香残基; 或 (f) 谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法在 W087/05330 (1987 年 9 月 11 日公开) 以及 Aplin 和 Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 页中有描述,并以引用的方式并入本发明。可以通过化学和 / 或酶学的方法完成移除 ActRIIa 多肽上的一个或多个碳

水化合物。化学去糖基化可涉及,例如,ActRIIa 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的糖(N-乙酰基葡萄糖或N-乙酰基半乳糖胺)之外的大部分或所有的糖的切除,而同时保持氨基酸序列的完整。化学去糖基化在Hakimuddin等.(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259 :52 以及 Edge 等.(1981) Anal. Biochem. 118 :131 中有进一步的描述。ActRIIa 多肽上的碳水化合物的酶学切除可以通过使用由Thotakura等.(1987) Meth. Enzymol. 138 :350 所描述的各种内糖苷酶或外糖苷酶来实现。ActRIIa 多肽的序列可以适当地调节,其依赖于所采用的表达体系的类型,如哺乳动物、酵母、昆虫以及植物细胞均可以引入不同的糖基化模式,其可以被肽的氨基酸序列所影响。通常情况下,用于人类的ActRIIa 多肽可以在能提供正确的糖基化的哺乳动物细胞系中表达,如HEK293 细胞或CHO 细胞系,尽管可以预期其它的哺乳动物表达细胞系、具有工程的糖基化酶的酵母细胞系以及昆虫细胞系也可以用于表达。

[0116] 本发明进一步地涵盖了生成突变子的方法,特别是ActRIIa 多肽的成套组合突变体以及截断突变体的方法;组合突变体的库对于鉴别功能性的变体序列特别有用。筛选这样的组合文库的目的在于产生,例如,或作为激动剂或作为拮抗剂作用的ActRIIa 多肽的变体,或替代地,具有所有新活性的突变体。各种筛选方法在下面提供,并且这样的方法可用于评估变体。例如,ActRIIa 多肽的变体可以通过结合至ActRIIa 配体而防止ActRIIa 配体结合至ActRIIa 多肽或干扰通过ActRIIa 配体引起的信号的能力来筛选。

[0117] ActRIIa 多肽或其变体的活性也可以在细胞基础上或在体内测试。例如,可以评估ActRIIa 多肽变体在表达涉及骨骼生产或骨骼破坏的基因的效果。如果需要,这可以在一个或多个重组的ActRIIa 配体蛋白(例如,activin)的存在时完成,并且细胞可以被转染以生产ActRIIa 多肽和/或其变体以及(视情况)ActRIIa 配体。同样地,ActRIIa 多肽可以施用给小鼠或其它动物,并且评估一种或多种骨骼特性诸如密度或容积。骨折的治愈率也可以被评估。双能X射线吸收测定(DEXA)是一种成熟的、非侵入的评估动物中的骨密度的定量技术。人的中枢DEXA系统可以用于评估脊椎和骨盆的骨密度。这些是总骨骼密度最好的预测体。外周DEXA系统可以用于评估外周骨骼的密度,包括例如,手、腕、脚踝以及足的骨骼。传统的x射线图象系统,包括CAT扫描,可以用于评估骨骼生长以及骨折愈合。骨骼的机械强度也可以被评估。

[0118] 组合来源的变体可以生成,其相对于天然存在的ActRIIa 多肽具有选择性的或通常的增长的潜能。同样地,突变可以导致变体具有戏剧性地不同于相应的野生型ActRIIa 多肽的胞内半衰期。例如,改变的蛋白对于蛋白水解或其它的导致其被破坏的细胞进程或相反地天然ActRIIa 多肽的失活或者更稳定或者更不稳定。这样的变体以及编码它们的基因,可以利用来通过调节ActRIIa 多肽的半衰期来改变ActRIIa 多肽的水平。例如,短半衰期可以导致更多的瞬时生物学效应以及可允许更紧密地控制患者体内的重组ActRIIa 多肽的水平。在Fc融合蛋白中,突变可以是在连接子中(如果有)和/或Fc部分以改变蛋白的半衰期。

[0119] 重组文库可以通过编码多肽文库的简并基因文库的方式产生,所述的每个多肽均包括至少一部分潜在的ActRIIa 多肽序列。例如,合成的寡核苷酸混合物可以酶学地接入基因序列使得潜在的ActRIIa 多肽核苷酸序列的简并形式可作为单独的多肽表达,或替代地,作为更大的融合蛋白的形式(例如,噬菌体展示)表达。

[0120] 有很多中潜在同源物的文库从简并寡核苷酸序列中产生的方法。简并基因序列的化学合成可以在 DNA 自动合成仪中进行,并且合成的基因随后被连接入合适的表达用的载体。简并寡核苷酸的合成在本领域是公知的(参见例如,Narang, SA(1983)Tetrahedron 39:3;Itakura 等,(1981)重组 DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, 编辑. AG Walton, Amsterdam:Elsevier 273-289 页;Itakura 等,(1984)Annu. Rev. Biochem. 53:323;Itakura 等,(1984)Science 198:1056;Ike 等,(1983)Nucleic Acid Res. 11:477)。这些技术已被应用于其它蛋白的定向进化(参见例如,Scott 等,(1990)Science 249:386-390;Roberts 等,(1992)PNAS USA 89:2429-2433;Devlin 等,(1990)Science 249:404-406;Cwirla 等,(1990)PNAS USA 87:6378-6382;以及美国专利 5,223,409、5,198,346 和 5,096,815)

[0121] 或者,其它形式的突变可用于产生组合文库。例如,ActRIIa 多肽的变体可以产生并通过采用例如丙氨酸筛选突变以及类似的(Ruf 等,(1994)Biochemistry 33:1565-1572;Wang 等,(1994)J. Biol. Chem. 269:3095-3099;Balint 等,(1993)Gene 137:109-118;Grodberg 等,(1993)Eur. J. Biochem. 218:597-601;Nagashima 等,(1993)J. Biol. Chem. 268:2888-2892;Lowman 等,(1991)Biochemistry 30:10832-10838;和 Cunningham 等,(1989)Science 244:1081-1085)、通过接头分区突变(Gustin 等,(1993)Virology 193:653-660;Brown 等,(1992)Mol. Cell Biol. 12:2644-2652;McKnight 等,(1982)Science 232:316)、通过饱和突变(Meyers 等,(1986)Science 232:613)、通过 PCR 突变(Leung 等,(1989)Method Cell Mol Biol 11:11-19)或通过随机突变,包括化学突变等(Miller et al., (1992)A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY;and Greener 等,(1994)Strategies in Mol Biol 7:32-34)从文库中筛选分离出来。接头分区突变,特别地是在组合设定中,是一种有吸引力的鉴别截短(生物活性)形式的 ActRIIa 多肽的方法。

[0122] 用于筛选通过点突变和截短得到的组合文库中的基因产品的范围广泛的技术是本领域公知的,并且,就此而言,对筛选具有某种特性的基因产品的 cDNA 文库。这样的技术通常适应于快速筛选通过 ActRIIa 多肽的组合突变生成的基因文库。最广泛地用于筛选大的基因文库的技术通常包括克隆基因文库入可复制的表达载体、以获得的载体文库转化合适的细胞、并且在检测合意的活性使得分离编码所检测的产物的基因的载体相对容易的条件下表达组合基因。优选的方法包括 activin 结合分析以及 activin 调节的细胞信号分析。

[0123] 在某些实施方式中,本发明的 ActRIIa 多肽可以进一步包括翻译后的修饰任何天然存在于 ActRIIa 多肽的。这样的修饰包括但不限于,乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化以及酰基化。结果是,修饰后的 ActRIIa 多肽可包含非氨基酸元件,诸如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸盐。这样的非氨基酸元件在 ActRIIa 多肽的功能上的效果可以如本发明所述的对于其它的 ActRIIa 多肽变体那样测试。当 ActRIIa 多肽通过剪切 ActRIIa 多肽的初生形式而在细胞内生成时,翻译后进程对蛋白质的正确折叠和/或功能也是重要的。不同的细胞系(诸如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293)对于这样的翻译后行为具有特异的细胞机器以及特有的机制,并且可被选用来确保正确修饰和 ActRIIa 多肽的进程。

[0124] 在某些方面,ActRIIa 多肽的功能性变体或修饰形式包括具有至少一部分

ActRIIa 多肽和一个或多个融合结构域的融合蛋白。公知的这样的融合结构域的例子包括但不限于多聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽转移酶 (GST)、硫氧还蛋白、A 蛋白、G 蛋白、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合意的特性。例如,一些融合结构域特定地用于通过亲和层析分离融合蛋白。为达到亲和纯化的目的,采用亲和层析相关的基质诸如谷胱甘肽、淀粉酶以及镍缀合或钴缀合的树脂。许多这样的基质可以以“试剂盒”的形式获得,诸如 Pharmacia GST 纯化体系以及 QIAexpress™ 体系 (Qiagen) 与有用的 (HISg) 融合伴侣。作为另外的例子,可以选择融合结构域以有助于检测 ActRIIa 多肽。这样的检测结构域的例子包括各种荧光蛋白 (例如 GFP) 以及“表位标记”,其通常是可获得的特异抗体的短肽序列。公知的对于特异单克隆抗体的表位标记容易获得,包括 FLAG、流感病毒血凝素 (HA) 以及 c-myc 标记。在一些例子中,融合结构域具有诸如对于 Xa 因子或凝血酶的蛋白酶切位点,其允许相关的蛋白酶部分地消化融合蛋白并因而从中释放重组蛋白。释放的蛋白然后通过随后的层析分离而从融合结构域中分离。在某些优选的实施方式中,ActRIIa 多肽融合有在体内稳定 ActRIIa 多肽的结构域 (“稳定器”结构域)。通过“稳定”意味着可以增加血清半衰期的任何物质,不考虑其是否是因为降低了破坏、肾脏清除的降低或其它药物动力学效应。已知与免疫球蛋白的 Fc 部分的融合可赋予范围广泛的蛋白以合意的药物动力学特性。此外,融合人血清白蛋白可赋予合意的特性。可选择的其它类型的融合结构域包括多聚结构域 (例如二聚、四聚) 以及功能性结构域 (其赋予另外的生物学功能,诸如进一步刺激骨骼生长或肌肉生长,如所希望的那样)。

[0125] 作为特定的例子,本发明提供了包括融合至 Fc 结构域 (例如 SEQ ID NO:6) 的 ActRIIa 的可溶性胞外结构域的融合蛋白。

[0126] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD (A) VSHEDPEVKF

[0127] NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKAL

[0128] PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

[0129] GQPENNYKTTTPVLDSDGPFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYT QKSLSLSPGK*

[0130] 可选择地,Fc 结构域在残基 (诸如天冬氨酸 265、赖氨酸 322 以及天冬酰胺 434) 中具有一个或多个突变。在某些例子中,具有一个或多个这样的突变 (例如天冬氨酸 265 突变) 的突变体 Fc 结构域相对于野生型的 Fc 结构域具有削减的结合至 Fc γ 受体的能力。在其它例子中,具有一个或多个这样的突变 (例如天冬酰胺 434 突变) 的突变体 Fc 结构域相对于野生型的 Fc 结构域具有增加的结合至 MHC I 类相关 Fc 受体 (FcRN) 的能力。

[0131] 当然,融合蛋白的不同元件可以以任何与想得到的功能相一致的方式安排。例如,ActRIIa 多肽可以置于异源结构域的 C 末端,或替代地,异源结构域可置于 ActRIIa 多肽的 C 末端。ActRIIa 多肽结构域和异源结构域不需要在融合蛋白中紧邻,并且附加的结构域或氨基酸序列可以包括 C 末端或 N 末端至两个结构域之一或处于两个结构域之间。

[0132] 在某些实施方式中,本发明的 ActRIIa 多肽含有一个或多个可以稳定 ActRIIa 多肽的修饰。例如,这样的修饰增强 ActRIIa 多肽在体内的半衰期,增强 ActRIIa 多肽的循环半衰期或减少 ActRIIa 多肽的蛋白降解。这样的稳定修饰包括但不限于融合蛋白 (包括,例如,包含 ActRIIa 多肽和稳定器结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰 (包括,例如,附加糖基化位点至 ActRIIa 多肽) 以及碳水化合物的修饰 (包括,例如,从 ActRIIa 多肽中移

除碳水化合物)。就融合蛋白而言,ActRIIa 多肽融合至诸如 IgG 分子的稳定器结构域(例如 Fc 结构域)。如同本发明所应用的,术语“稳定器结构域”不仅指代融合蛋白中的融合结构域(例如 Fc),而且包括诸如碳水化合物的非蛋白质修饰或诸如聚乙二醇的非蛋白质聚合体。

[0133] 在某些实施方式中,本发明使得可获得分离形式和/或纯化形式的 ActRIIa 多肽,其分离自或相反地基本上从其它蛋白游离。ActRIIa 多肽通常通过从重组核酸表达而产生。

[0134] 3. 编码 ActRIIa 多肽的核酸

[0135] 在某些方面,本发明提供了分离的和/或重组的编码任何 ActRIIa 多肽(例如可溶性 ActRIIa 多肽)包括片段、功能性变体和本发明所公开的融合蛋白的核酸。例如,SEQ ID NO:4 编码天然存在的人 ActRIIa 前体多肽,而 SEQ ID NO:5 编码 ActRIIa 的加工的胞外结构域。目标核酸可以是单链的或双链的。这样的核酸可以是 DNA 分子或 RNA 分子。这些核酸可以用于,例如,制造 ActRIIa 多肽的方法或直接的治疗剂(例如,在基因治疗方法中)。

[0136] 在某些方面,应进一步了解编码 ActRIIa 多肽的目标核酸包括 SEQ ID NO:4 或 5 的变体的核酸。变体核苷酸序列包括一个或多个核苷酸取代、添加或删除的不同的序列,诸如等位基因变体。

[0137] 在某些实施方式中,本发明提供了与 SEQ ID NO:4 或 5 具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的分离的或重组的核酸序列。本领域普通技术人员应当了解与 SEQ ID NO:4 或 5 互补以及与 SEQ ID NO:4 或 5 的变体互补的核酸序列都可以包括在本发明的范围内。在进一步的实施方式中,本发明的核酸序列可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合的或在 DNA 文库中。

[0138] 在其它的实施方式中,本发明的核酸还可以包括在严谨条件下杂交至 SEQ ID NO:4 或 5 中指定核苷酸序列、SEQ ID NO:4 或 5 的互补序列或其片段的核苷酸序列。如上面所讨论的,本领域普通技术人员应当容易了解,促进 DNA 杂交的适宜的严谨条件可以变动。例如,可以在 6.0x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)在约 45℃ 进行杂交,随后在 50℃ 以 2.0x SSC 洗涤。例如,洗涤步骤的盐浓度可以选择从 2.0x SSC、50℃ 的低严谨条件至 0.2x SSC、50℃ 的高严谨条件。另外,洗涤步骤的温度可以从约 22℃ 的室温的低严谨条件至约 65℃ 的高严谨条件。温度和盐都可以变动,或者温度或者盐浓度可在另一个可变条件改变是保持恒定。在某些实施方式汇总,本发明提供了在 6x SSC、室温的低严谨条件下杂交、随后在室温下以 2x SSC 洗涤的核酸。

[0139] 由于遗传密码子的简并而与 SEQ ID NO:4 或 5 中的核酸不同的分离的核酸分子也包括在本发明的范围内。例如,大量的氨基酸通过不止一个的三联密码子指定。指向相同的氨基酸的密码子或同义密码子(例如,CAU 和 CAC 是组氨酸的同义密码子)可以导致“沉默”突变,其不会影响蛋白质的氨基酸序列。然而,我们预期确实导致目标蛋白的氨基酸序列的变化的 DNA 序列的多态性存在于哺乳动物细胞中。本领域技术人员应当了解编码特定蛋白的核酸的在一个或多个核苷酸(至多 3-5% 的核苷酸)上的变异由于天然的等位变异可以存在于给定种属的个体中。任意或全部的这样的核苷酸的变异以及导致的氨基酸多态性都在本发明的范围内。

[0140] 在某些实施方式中,本发明的重组核酸可操作的连接到表达构建物的一个或多个

调节核苷酸序列。调节何干算序列通常适宜于表达所应用的诉诸细胞。本领域公知用于各种宿主细胞的很多类型的适宜的表达载体以及合适的调节序列。通常地,所述的一个或多个调节核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子序列。本领域公知的构建的或诱导的启动子被本发明所涵盖。启动子或者是天然存在的启动子,或者是一个以上的启动子组合元件的杂合启动子。表达构建物可存在于细胞内的游离体上,诸如质粒,或表达构建物插入染色体内。在一个优选的实施方式中,表达载体包含可选择的标记基因以允许选择转化宿主。可选择的标记基因是本领域公知的并且随采用的宿主细胞而变化。

[0141] 在本发明的某些方面,目标核酸提供在一个包含编码 ActRIIa 多肽的核苷酸序列的表达载体内,并可操作地连接至至少一个调节序列。调节序列是本领域公认的以及被选择来引导 ActRIIa 多肽的表达。相应地,术语调节序列包括启动子、增强子和其它表达控制元件。示范性的调节序列描述于 Goeddel ;基因表达技术:酶学方法,Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如,任意大范围的控制 DNA 序列表达的调节控制序列,当被可操作地连接时,可用于表达编码 ActRIIa 多肽的 DNA 序列的表达。这样的有用的表达控制序列包括,例如,SV40 的早期或晚期启动子、tet 启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV 启动子、乳糖操纵子系统、色氨酸系统、TAC 或 TRC 系统、由 T7RNA 聚合酶引导表达的 T7 启动子、 λ 噬菌体的主要操作和启动区域、fd 山羊蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子例如 Pho5、酵母 α -杂交因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子以及其它已知的控制原核细胞或真核细胞或它们的病毒基因及其各种重组体表达的序列。应当了解,表达载体的设计依赖于诸如待转化的宿主细胞和/或想表达的蛋白类型的选择的因子。此外,还应当考虑载体拷贝的数量、控制拷贝数量以及载体所编码的任何其它蛋白诸如抗生素标记的表达的能力。

[0142] 本发明的重组核酸可以通过连接克隆的基因或其片段入适合或在原核细胞中或在真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)中或在两者中表达的载体而生产。重组 ActRIIa 多肽的生产用表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括下列类型的质粒:用于诸如大肠杆菌的原核细胞中表达的 pBR322-来源的质粒、pEMBL-来源的质粒、pEX-来源的质粒、pBTac-来源的质粒以及 pUC-来源的质粒。

[0143] 一些哺乳动物表达载体同时包含有助于载体在细菌中繁殖的原核序列以及一个或多个表达于真核细胞的真核转录单元。PcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRC/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 以及 pHyg 来源的载体是适合真核细胞转染的哺乳动物表达载体的例子。这些载体中的一部分被细菌质粒来源的序列所修饰,诸如 pBR322,以有助于在原核细胞和真核细胞中的复制以及药物抗性选择。另一选择为,病毒的衍生物诸如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或 eb 病毒(pHEBo、pREP 来源的以及 p205)可用于在真核细胞中蛋白的瞬时表达。其它的病毒(包括逆转录病毒)表达体系的例子可以在下面基因治疗导入系统的描述中找到。制备质粒以及转化宿主生物体的过程中所采用的各种方法是本领域公知的。其它的同时适合原核以及真核细胞的表达系统以及通常的重组过程,参见 Molecular Cloning A Laboratory Manual,第三版,由 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编辑(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在某些例子中,采用牛乳头瘤病毒表达系统来表达重组多肽是合适的。这样的牛乳头瘤病毒表达体系的例子包括

pVL- 来源的载体 (诸如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941)、pAcUW- 来源的载体 (诸如 pAcUW1) 以及 pBlueBac- 来源的载体 (诸如包含 pBlueBacIII 的 β 半乳糖苷酶)。

[0144] 在优选的实施方式中,载体被设计为在 CHO 细胞中生产目标 ActRIIa 多肽,诸如 Pcmv-Script 载体 (Stratagene, La Jolla, Calif)、pcDNA4 载体 (Invitrogen, Carlsbad, Calif) 和 pCI-neo 载体 (Promega, Madison, Wisc)。显然地,目标基因构建物可用于引起目标 ActRIIa 多肽在培养基中繁殖的细胞中的表达,例如,以产生蛋白,包括融合蛋白或突变体蛋白,用于纯化。

[0145] 本发明还涉及转染了重组基因的宿主细胞,所述的宿主基因包括编码一个或多个目标 ActRIIa 多肽的编码序列 (例如,SEQ ID NO:4 或 5)。宿主细胞可以是任何的原核或真核细胞。例如,本发明的 ActRIIa 多肽表达在细菌中,诸如大肠杆菌、昆虫细胞 (例如采用牛乳头瘤病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员所公知的。

[0146] 相应地,本发明进一步地涉及生产目标 ActRIIa 多肽的方法。例如,转化了编码 ActRIIa 多肽的表达载体可在适宜的条件下培养以允许 ActRIIa 多肽表达。ActRIIa 多肽可从细胞以及包含 ActRIIa 多肽的基质的混合物中分泌并分离出来。另外的选择是,ActRIIa 多肽可留在细胞质中或作为膜组分并收获细胞、溶解并分离蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、基质和其它副产品。合适的细胞培养基是本领域公知的。目标 ActRIIa 多肽可从细胞培养基质、宿主细胞或同时从两者中分离,采用本领域公知的技术纯化蛋白,包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、采用特异于 ActRIIa 多肽的特定表位的抗体的免疫亲和纯化以及采用结合至融合到 ActRIIa 多肽的结构域的制剂的亲和纯化 (例如,A 蛋白柱可用于纯化 ActRIIa-Fc 融合蛋白)。在一个优选的实施方式中,ActRIIa 多肽是包含有助于纯化的结构域的融合蛋白。在一个优选的实施方式中,纯化通过一系列的柱层析步骤而达到,包括,例如,以任何顺序的三个或更多的以下步骤:A 蛋白层析、Q 琼脂糖层析、苯基琼脂糖层析、尺寸排阻层析以及阳离子交换层析。纯化可以通过病毒过滤和缓冲交换而完成。如本发明所证明的,ActRIIa-hFc 蛋白纯化至以尺寸排阻层析确定大于 98% 而以 SDS PAGE 确定大于 95% 的纯度。这样的纯度对于在小鼠的骨骼上获得想要的效果以及在小鼠、大鼠和非人灵长类中的可接受的药物安全性来说是足够的。

[0147] 在另一实施方式中,编码纯化前导序列的融合基因,诸如重组 ActRIIa 多肽合意部分 N 末端位置的多聚-(组氨酸)/肠激酶切割位点序列,可允许采用 Ni^{2+} 金属树脂通过亲和层析纯化所表达的融合蛋白。纯化前导序列随后通过肠激酶处理而移除以提供纯化的 ActRIIa 多肽 (例如,参见 Hochuli 等,(1987) J Chromatography 411:177; 以及 Janknecht 等,PNAS USA 88:8972)。

[0148] 制备融合蛋白的技术是本领域公知的。本质上,编码不同的多肽序列的各种 DNA 片段的连接是通过相应的传统技术完成的,采用 blunt-ended 或 stagger-ended 末端来连接、限制性酶消化以提供合适的末端、适当的情况下填补粘性末端、碱性磷酸酶处理以避免不想要的连接,以及酶连接。在另一实施方式中,融合基因可以通过传统技术包括自动 DNA 合成仪来合成。或者,基因片段的 PCR 扩增可采用接头引物来执行,所述的接头引物使两个连续的可随后退火以产生嵌合基因序列的基因片段之间互补悬垂 (参见例如,Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等编辑, John Wiley & Sons:1992)。

[0149] 4. 选择性的 Activin 和 ActRIIa 拮抗剂

[0150] 本发明所提供的数据证明了 activin-ActRIIa 信号的拮抗剂可用于促进骨骼生长以及骨矿化。尽管可溶性的 ActRIIa 多肽,特别是 ActRIIa-Fc,是优选的拮抗剂,并且尽管这样的拮抗剂可通过不止 activin 拮抗的机制来影响骨骼(例如,activin 抑制可以具有抑制光谱分子活性趋向的指示剂,包括,可能的,TGF-beta 超家族的其它成员,并且这样的群体抑制可能导致所希望的骨骼上的效果),可以预期其它类型的 activin-ActRIIa 拮抗剂是有效的,包括抗-activin(例如 A、B、C 或 E) 抗体、抗 ActRIIa 抗体、反义物、抑制 ActRIIa 生产的 RNAi 或核酶核酸以及其它的 activin 或 ActRIIa 的抑制剂,特别是那些破坏 activin-ActRIIa 结合的抑制剂。

[0151] 特异地与 ActRIIa 多肽(例如,可溶性的 ActRIIa 多肽)反应的抗体、以及或者竞争性结合而与 ActRIIa 多肽配合的或者相反地抑制 ActRIIa 调节的信号的物质可用作 ActRIIa 多肽活性的拮抗剂。此外,特异地与 activinA 多肽反应的抗体以及破坏 ActRIIa 结合的抗体也可用作拮抗剂。

[0152] 采用来自 ActRIIa 多肽或 activin 多肽的免疫原,可通过标准方法(参见,例如,A Laboratory Manual 由 Harlow 和 Lane 编辑(Cold Spring Harbor Press:1988))制备抗-蛋白/抗-多肽抗血清或单克隆抗体。哺乳动物,诸如小鼠、仓鼠或家兔可用 ActRIIa 多肽的免疫原形式、能够引发抗体反应的抗原性片段或融合蛋白免疫。赋予蛋白或多肽免疫原性的技术包括缀合载体或其它本领域公知的技术。ActRIIa 或 activin 多肽的免疫原性部分可在佐剂存在的情况下施用。免疫过程可通过检测抗体在血浆或血清中的滴度来检测。标准 ELISA 或其它的免疫方法可与作为抗原的免疫原一起使用以评估抗体水平。

[0153] 在以 ActRIIa 多肽的抗原性制剂免疫动物之后,得到抗血清,如果需要,可以从血清中分离多克隆抗体。为产生单克隆抗体,可从免疫的动物收集抗体产生细胞(淋巴细胞)并通过标准的体细胞融合步骤与诸如骨髓瘤细胞的永生细胞融合以生产杂交瘤细胞。这样的技术是本领域公知的,包括,例如,杂交瘤技术(最开始由 Kohler 和 Milstein 开发,(1975)Nature, 256:495-497)、人类 B 细胞杂交瘤技术(Kozbar 等,(1983)Immunology Today, 4:72)以及 EBV-杂交瘤技术来生产人单克隆抗体(Cole 等,(1985)单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc. 77-96 页)。杂交瘤细胞可以通过免疫化学筛选以生产与 ActRIIa 多肽特异性反应的抗体,并且单克隆抗体从包含这样的杂交瘤细胞的培养基中分离。

[0154] 本发明所用的术语“抗体”旨在包括那些也能与目标多肽特异性反应的片段。抗体可采用传统的技术片段化,并且用上面所描述的用于全抗体的同样的方法筛选片段。例如,F(ab)₂ 片段可以通过以胃蛋白酶处理生成。产生的 F(ab)₂ 片段可以处理以较少二硫桥键来生产 Fab 片段。本发明的抗体进一步旨在包括双特异的、单链的、嵌合的、人源化以及由至少一个抗体 CDR 区域赋予的 ActRIIa 或 activin 多肽亲和性的全长人类分子。抗体可进一步包括另外附加并能够被检测的标签(例如,标签可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或辅酶因子)。

[0155] 在某些实施方式中,抗体是重组抗体,其术语包括了任意的部分地以分子生物学技术产生的抗体,包括 CDR 移植的抗体或嵌合抗体、人的或组装自文库选择的抗体结构域的抗体、单链抗体以及单结构域抗体(例如,人 V_H 蛋白或 camelid V_H 蛋白)。在某些实施

方式中,本发明的抗体是单克隆抗体,并且在某些实施方式中,本发明使得生产新抗体的方法成为可能。例如,一种生产特异地结合至 ActRIIa 多肽或 activin 多肽的单克隆抗体的方法,包括给小鼠施用一定剂量的包含有效量的刺激可检测的免疫反应的抗原多肽的免疫原组合物,从小鼠中获得抗体生产细胞(例如,脾脏中的细胞)并将抗体生产细胞与骨髓瘤细胞融合以获得抗体生产杂交瘤,检测抗体生产杂交瘤以鉴别可以生产特异性结合抗原的单克隆的杂交瘤。一旦获得,从细胞培养基中繁殖杂交瘤,视情况在杂交瘤来源的生产特异性结合抗原的细胞的培养条件下。单克隆抗体可从细胞培养基中纯化。

[0156] 形容词“特异地与之反应”在此指代抗体,意思是,如本领域通常理解的那样,抗体在特定生物样品中的感兴趣的抗原(例如,ActRIIa 多肽)和其它的非感兴趣的抗原之间具有充分的选择性的。在某些采用抗体的方法中,诸如治疗应用中,结合的高度特异性是必要的。单克隆抗体通常具有更大的趋向(与多克隆抗体相比)有效地在合意的抗原以及交叉反应的多肽间区别。影响抗体:抗体相互作用特异性的特征是抗体对抗原的亲合力。尽管所希望的特异性可达到不同亲和力的范围,通常优选的抗体具有约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更少的亲合力(解离常数)。给定 activin 和 ActRIIa 之间的格外紧密的结合,我们预期中和性的抗 activin 抗体或抗 ActRIIa 抗体通常具有 10^{-10} 或更少的解离常数。

[0157] 另外,用于筛选抗体以鉴定合意的抗体的技术可影响获得的抗体的特性。例如,如果抗体用于在溶液中结合抗原,测试溶液结合可能是合适的。各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别特定期望的抗体。这样的技术包括 ELISAs、表面等离子体共振结合分析(例如, the Biacore™ binding assay, Biacore AB, Uppsala, Sweden)、夹心法(例如, the paramagnetic bead system of IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland)、western 免疫印迹、免疫沉淀反应以及免疫组化。

[0158] Activin 或 ActRIIa 拮抗剂的核酸化合物种类的例子包括反义核酸、RNAi 构建物以及催化核酸构建物。核酸化合物可以是单链的或双链的。双链核酸化合物还可以包括悬臂或非互补的区域,其中一个或另外一个片段是单链。单链化合物可包括自身互补的区域,意味着化合物形成称为“发夹”或“茎环”结构,具有一个双链螺旋结构的区域。核酸化合物可包括互补于包含全长 ActRIIa 核酸序列或 activin β A 或 activin β B 核酸序列的不超过 1000、不超过 500、不超过 250、不超过 100 或不超过 50、35、30、25、22、20 或 18 个核苷酸区域的核苷酸序列。优选的互补区域至少是 8 个核苷酸,视情况地至少 10 个或至少 15 个核苷酸,并且视情况地在 15 到 25 个核苷酸之间。互补区域可属于内含子、靶转录子的编码序列或非编码序列诸如编码序列部分。通常地,核酸化合物具有 8 到约 500 个核苷酸或碱基对的长度,视情况长度可以是约 14 到约 50 个核苷酸。核酸可以是 DNA(特定地作为反义核酸使用)、RNA 或 RNA:DNA 杂合物。任何一条链可包括 DNA 和 RNA 的混合物,以及不容易被区分为 DNA 或 RNA 的修饰的形式。此外,双链化合物可以是 DNA:DNA、DNA:RNA 或 RNA:RNA,并且任何一条链可以包括 DNA 和 RNA 的混合物,以及不容易被区分为 DNA 或 RNA 的修饰的形式。核酸化合物可以包括任意的各种修饰,包括骨架(天然核酸的糖-磷酸部分,包括核苷间键合)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一个或多个修饰。反义核酸化合物优选具有约 15 到约 30 核苷酸长,并通常包含一个或多个修饰以改善诸如血清中的稳定性、在细胞中或在化合物可能的给药位置的特性,所述的给药位置为诸如胃部(在口服给药的情况下)以及肺脏(对于吸入化合物)。在 RNAi 构建物的情况下,互补至靶转录子的链通

常是 RNA 或其修饰。其它链可以是 RNA、DNA 或任何其它的变体。双链或单链“发夹”RNAi 构建物的双相部分优选地为 18 到 40 个核苷酸长度,视情况为约 21 到 23 个核苷酸长度,只要其可作为 Dicer 底物起作用。催化的或酶促核酸可以是核酶或 DNA 酶,并还可包含修饰的形式。核酸化合物在生理条件下,以无义或有义控制基本不产生或不产生效果的浓度,与细胞相接触,可抑制约 50%、75%、90% 或更多的靶的表达。优选的检测核酸化合物的效果的浓度是 1、5 以及 10 个微摩尔。核酸化合物可用于测试例如在骨骼生长以及骨矿化上的效果。

[0159] 5. 筛选方法

[0160] 在某些方面,本发明涉及采用 ActRIIa 多肽(例如,可溶性 ActRIIa 多肽)以及 activin 多肽来鉴定能够激动或拮抗 activin-ActRIIa 信号通路的化合物(药物)。通过这种筛选鉴定药剂可测试以评估它们在体内调节骨骼生长和骨矿化的能力,视情况,这些化合物可以进一步地在动物中测试以评估它们在体内调节组织生长的能力。

[0161] 有非常多的用于筛选通过靶定 activin 和 ActRIIa 多肽以调节组织生长的治疗剂的途径。在某些实施方式中,化合物的高通量筛选可用于鉴别干扰 activin 或 ActRIIa 在骨骼上的调节效果的药剂。在某些实施方式中,该方法用于筛选和鉴定特异性抑制或减少 ActRIIa 多肽结合至 activin 的化合物。或者,该方法用于鉴定增强 ActRIIa 多肽结合至 activin 的化合物。在另一个实施方式中,化合物可通过其与 activin 或 ActRIIa 多肽相互作用的能力来鉴定。

[0162] 各种方法的版本是足够的并在本发明公开的范围内,然而那些本发明没有清楚地描述的可被本领域普通技术人员领会。如同本发明所描述的,本发明的检测化合物(药剂)可通过任何的组合化学方法制造。或者,目标化合物可以是天然存在的在体内或体外合成的生物分子。待测其作为组织生长调节剂能力的化合物(药剂)可通过例如细菌、酵母、植物或其它生物体(例如,天然产品)生产,或化学生产(例如,小分子,包括拟肽),或重组地生产。本发明所涵盖的检测化合物包括非肽有机分子、肽、多肽、拟肽、糖、激素和核酸分子。在特定的实施方式中,检测药剂是分子量小于约 2000 道尔顿的小有机分子。

[0163] 本发明的检测化合物可以是单个的、离散的实体,或是具有更大复杂度的文库,诸如以组合化学制备的库。这些库可包括,例如,乙醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚以及其它类别的有机化合物。检测化合物在检测系统中的存在可以是单独形式的或以化合物的混合物的形式,特别是在起始筛选步骤中。视情况,化合物可视情况与其它化合物衍生以及衍生群体有助于化合物分离。非限制性的衍生物群体的例子包括生物素、荧光素、地高辛、绿色荧光蛋白、同位素、多聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽转移酶(GST)、光学激活交联剂(photoactivatable crosslinkers)或其任意的组合。

[0164] 在许多检测化合物库以及天然提取物的药物筛选程序中,高通量的方法是为了在给定时间内最大化检测化合物数量所需要的。这种在无细胞环境下的方法,诸如可到处纯化或半纯化蛋白的,通常优选作为“主要的”筛选方法,其允许快速发展以及相对容易地检测被检测化合物调节的靶分子的变化。此外,检测化合物的细胞毒性或生物利用度在体外系统中可以忽视,该方法转而主要集中在药物在靶分子上的效果,其可表现在 ActRIIa 多肽和 activin 的结合亲和力的改变上。

[0165] 仅仅是举例说明,在本发明的示例性筛选方法中,感兴趣的化合物与分离并纯化

的通常可结合至 activin 的 ActRIIa 多肽相接触。化合物与 ActRIIa 多肽的混合物中随后加入包含 ActRIIa 配体的组合物。ActRIIa/activin 复合物的检测和定量提供了一种确定化合物抑制（或加强）ActRIIa 多肽与 activin 之间的复合物形成效力的方法。化合物的效力可通过采用测试化合物的各种浓度获得的数据而生成的剂量反应曲线而评估。此外，对照分析可用于提供比较的基准。例如，在对照分析中，分离并纯化的 activin 加入至包含 ActRIIa 多肽的组合物中，在没有测试化合物的情况下定量 ActRIIa/activin 复合物。应当了解，通常的，反应物混合的顺序可以变化，并且可以同时混合。此外，代替纯化蛋白的细胞提取物和溶解物可用于提供合适的无细胞分析系统。

[0166] ActRIIa 多肽与 activin 的复合物的形成可以由各种技术检测。例如，复合物形成的调节可采用例如可检测标记的蛋白诸如放射性标记的（例如， ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H ）、荧光素标记（例如 FITC）的或酶标记的 ActRIIa 多肽或 activin，通过免疫测定或层析检测来定量。

[0167] 在某些实施方式中，本发明涵盖了荧光偏振法以及荧光共振能量转移（FRET）在直接或间接测量 ActRIIa 多肽与其结合蛋白的相互作用上的应用。进一步的，其它的检测模式，诸如基于光波导的（PCT Publication W096/26432 以及美国专利 5,677,196）、表面等离子体共振（SPR）、表面电荷传感以及表面受力传感，都与本发明的许多实施方式相一致。

[0168] 此外，本发明涵盖了相互作用陷阱方法（也被叫做“双杂交方法”）的应用，以鉴定破坏或加强 ActRIIa 多肽与其结合蛋白的相互作用的药剂。参见例如，美国专利 5,283,317；Zervos 等（1993）Cell 72:223-232；Madura 等（1993）J Biol Chem 268:12046-12054；Bartel 等（1993）Biotechniques 14:920-924；以及 Iwabuchi 等（1993）Oncogene 8:1693-1696。在特定的实施方式中，本发明涵盖了应用反向双杂交系统以鉴定分离 ActRIIa 多肽与其结合蛋白的相互作用的化合物（例如，小分子或肽）。参见例如，Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29；Vidal 和 Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81；以及美国专利 5,525,490；5,955,280；和 5,965,368。

[0169] 在某些实施方式中，目标化合物通过其与本发明的 ActRIIa 或 activin 多肽相互作用的能力来鉴定。化合物与 ActRIIa 或 activin 多肽之间的相互作用是共价的或非共价的。例如，这种相互作用可以采用体内生物化学方法在蛋白水平上鉴定，

[0170] 所述的生物化学方法包括光交联、同位素标记的配体结合以及亲和层析（Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46:1）。在某些例子中，化合物可通过某些机制为基础的诸如检测结合到 activin 或 ActRIIa 多肽的化合物的方法来筛选。这可包括固相或液相结合。或者，编码 activin 或 ActRIIa 多肽的基因可与报告系统（例如， β 半乳糖苷酶、荧光素酶或绿色荧光蛋白）一同转染入细胞中并优选地以高通量筛选来筛选文库，或与文库中的个体一同转染。其它基于结合方法的机制可用于，例如，检测自由能变化的结合分析。结合分析可与固定至孔、珠子或芯片或被固定化的抗体俘获或被毛细管电泳所分解的靶一同进行。被限制住的化合物通常可采用比色法或荧光或表面等离子体共振来测量。

[0171] 在某些方面，本发明提供了调节（刺激或抑制）骨骼形成以及增加骨骼质量的方法和药剂。因此，任何鉴定的化合物可在全细胞或组织中、在体外或体内测试，以确定其调节骨骼生长或骨矿化的能力。各种本领域公知的方法可用于这个目的。

[0172] 例如，ActRIIa 或 activin 多肽或检测化合物在骨骼或软骨生长上的效果可通过在细胞基础上测量 Msx2 的诱导或骨母细胞分化为成骨细胞来确定（参见例如，(Daluiski

等, Nat Genet. 2001, 27(1) :84-8 ;Hino 等, Front Biosci. 2004, 9 :1520-9)。其它细胞基础上分析的例子包括分析目标 ActRIIa 或 activin 多肽的成骨活性以及在间质祖细胞以及成骨细胞中测试化合物。举例说明, 表达 activin 或 ActRIIa 多肽的重组腺病毒可构建用于感染多能间质祖细胞 C3H10T1/2、成骨细胞前体 C2C12 以及成骨细胞 TE-85。成骨活性随后通过测量碱性磷酸酶、骨钙素以及基质矿化的诱导来确定(参见, 例如, Cheng 等, J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8) :1544-52)。

[0173] 本发明还涵盖了体内检测骨骼或软骨生长的方法。例如, Namkung-Matthai 等, Bone, 28 :80-86 (2001) 公开了一种大鼠骨质疏松模型, 其研究了骨折后早期的骨骼修复。Kubo 等, Steroid Biochemistry&Molecular Biology, 68 :197-202 (1999) 也公开了一种大鼠骨质疏松模型, 其研究了骨折后晚期的骨骼修复。Andersson 等, J. Endocrinol. 170 :529-537 公开了小鼠的骨质疏松模型, 小鼠是去除卵巢的, 其导致小鼠丢失实质骨矿含量和骨矿密度, 其中松质骨丢失了大概 50% 的骨矿密度。去除卵巢的小鼠的骨骼密度可以通过施用一些诸如甲状旁腺激素的因子来提高。在某些方面, 本发明施用了本领域公知的骨折治愈方法。这些方法包括骨折技术、组织学分析和生物力学分析, 其在例如美国专利 6, 521, 750 中有描述, 以引用的形式整体地将其所公开的建立以及测量骨折的程度和修复进程的实验方法并入本发明。

[0174] 6. 示范性治疗应用

[0175] 在某些实施方式中, 本发明的 activin-ActRIIa 拮抗剂(例如, ActRIIa 多肽)可被用于治疗或防治与骨骼损伤相关的疾病或状况, 所述的损伤无论是例如, 通过断裂、损失或脱矿物质。在某些实施方式中, 本发明提供了通过给个体施用治疗有效剂量的 activin-ActRIIa 拮抗剂(特别是 ActRIIa 多肽)来治疗或预防有此需要的个体的骨骼损伤的方法。在某些实施方式中, 本发明提供了通过给个体施用治疗有效剂量的 activin-ActRIIa 拮抗剂(特别是 ActRIIa 多肽)来促进有此需要的个体的骨骼生长或矿化的方法。这些方法优选地着眼于动物的治疗以及预防性治疗, 更优选地, 着眼于人。在某些实施方式中, 本发明提供了 activin-ActRIIa 拮抗剂(特别是可溶性的 ActRIIa 多肽以及靶向 activin 或 ActRIIa 的中和性抗体)在治疗与低骨骼密度或降低的骨骼强度相关的疾病中的应用。

[0176] 如本发明所应用的, “预防”疾病或状况的治疗剂指的是在一个统计学样本中, 相对于未治疗样本, 可减少治疗样本的疾病或状况发生的化合物, 或者相对于未治疗样本, 延迟发作或减轻疾病或状况的一个或多个症状的严重程度的化合物。本发明所用的术语“治疗”包括预防指定的状况或一旦这种状况确定时改善或消除这种状况。在两者之中任何一种情况下, 预防或治疗以及预期的治疗剂施用结果由作诊断的医师来考虑。

[0177] 本发明提供了包括骨骼和 / 或软骨形成、预防骨骼丢失、增加骨矿化或预防骨骼脱矿的方法。例如, 目标 activin-ActRIIa 拮抗剂已应用于治疗骨质疏松以及骨折的治愈和人或动物中的软骨缺损。ActRIIa 或 activin 多肽对诊断为亚临床低骨骼密度的患者是有效的, 其作为对抗骨质疏松发展的保护性措施。

[0178] 在一个特异的实施方式中, 本发明的方法和组合物具有在人和其它动物的骨折愈合以及软骨缺损中的医疗效用。目标方法和组合物在闭合的以及开放的骨折复位以及人工关节的改良固定中还具有预防性的应用。成骨药剂诱导的 De novo 骨骼形成有助于先天性

的、外伤引起的或肿瘤切除引起的颅面畸形的修复,在医疗美容中也是有效的。在某些例子中,目标 activin-ActRIIa 拮抗剂可提供一种吸引骨骼形成细胞的环境,刺激骨骼形成细胞的生长或诱导骨骼形成前体细胞的分化。本发明的 activin-ActRIIa 拮抗剂在骨质疏松的治疗中也是有效的。

[0179] 本发明的方法和组合物可被应用于以骨骼损失为或导致骨骼损失为特征的状况,诸如骨质疏松(包括继发性骨质疏松)、甲状旁腺功能亢进、库欣病(Cushing's disease)、帕哲氏病(Paget's disease)、甲状腺功能亢进、慢性痢疾或吸收不良、肾小管性酸中毒或神经性厌食。

[0180] 骨质疏松可由各种因素引起或与之相关。对女性来说,特别是绝经后的女性,体重低,以及致使的久坐行为都是骨质疏松(丢失骨矿密度,致使骨折风险)的风险因素。具有任一下列特征的人可作为以 ActRIIa 拮抗治疗的候选人:绝经后的并且没有摄食雌激素或其它的激素替代疗法的女性;高(超过 5 英尺 7 英寸)或瘦(少于 125 磅)的绝经后的女性;具有骨骼损失相关的临床状况的男性;应用已知可导致骨骼损失的药物的人,包括诸如强的松(PrednisoneTM)的糖皮质激素、各种抗抽搐药物诸如苯妥英钠(DilantinTM)以及某些巴比妥盐,或高剂量的甲状腺替代药物;具有 I 型糖尿病、肝脏疾病、肾脏疾病或具有骨质疏松家族史的人;具有高骨转换(例如,尿样中胶原过多)的人;具有甲状腺状况诸如甲状腺功能亢进的人;轻度外伤后骨折的人;具有脊椎骨折或骨质疏松的其它现象的 x 射线证据的人。

[0181] 如同上面所提到的,骨质疏松也可以是与另一种疾病相关或与某种药物的使用相关的状况。药物导致的或其它医疗状况导致的骨质疏松被称为继发性骨质疏松。在一种叫库欣病(Cushing's disease)的状况中,身体所产生的过多的皮质醇导致骨质疏松和骨折。最通常的与继发性骨质疏松相关的药物是糖皮质激素,一类像皮质醇一样作用的药物,一种天然的由肾上腺产生的激素。尽管甲状腺激素(其由甲状腺产生)的适当水平是骨骼发育所必须的,过量的甲状腺激素可持续地降低骨量。当肾脏有问题的特别是透析的人摄入高剂量的包含铝的抗酸剂时可导致骨丢失。其它的可导致继发性骨质疏松的药剂包括用于预防癫痫的苯妥英(苯妥英钠(Dilantin))和巴比妥盐;甲氨喋呤(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS),一种用于一些类型的关节炎、癌症或免疫疾病的药物;环孢霉素(Sandimmune, Neoral),一种用于治疗一些自身免疫性疾病以及在器官移植的患者体内抑制免疫系统的药物;促黄体激素释放激素激动剂(Lupron, Zoladex),用于治疗前列腺癌和子宫内膜异位症;肝磷脂(Calciparine, Liqueamin),抗凝血药物;以及消胆胺(Questtran)和 colestipol(Colestid),用于治疗高胆固醇。癌症治疗导致的骨丢失被广泛地认识并被成为癌症治疗诱导的骨丢失(CTIBL)。骨转移可在骨骼上造成空穴,其可通过以 activin-ActRIIa 拮抗剂治疗和修正。

[0182] 在一个优选的实施方式中,本发明所公开的 activin-ActRIIa 拮抗剂,特别是可溶性的 ActRIIa,可应用与癌症患者。具有某种肿瘤的患者(例如,前列腺的、乳腺的、多发性骨髓瘤或任何引起甲状腺功能亢进的肿瘤),由于肿瘤诱导的骨丢失以及骨转移和治疗剂的原因而具有骨丢失的高风险。甚至是在缺乏骨丢失或骨转移的证据的情况下,这样的患者可以以 activin-ActRIIa 拮抗剂治疗。还可以监测患者的骨丢失或骨转移的证据,当指示器显示风险上升时以 activin-ActRIIa 拮抗剂治疗。通常地,采用 DEXA(双能 X 射线

骨密度测量研究)扫描评估骨密度的改变,而骨骼重构的指示器可用于评估骨转移的可能性。可监测血清标记。骨骼特异的碱性磷酸酶(BSAP)是一种在成骨细胞中存在的酶。骨转移以及其它导致骨骼重构增加的状况的患者的BSAP血液水平是上升的。骨钙素以及原骨胶原肽同样与骨骼形成和骨转移相关。在具有前列腺癌导致的骨转移的患者中,检测到BSAP的上升,并且不同程度的存在与乳腺癌导致的骨转移中。高水平的骨骼形态发生蛋白7(BMP-7)存在于已骨转移至骨骼的前列腺癌中,但是不存在于膀胱、皮肤、肝脏或肺癌癌症引起的骨转移中。I型羧基末端肽(ICTP)是一种在骨骼吸收期间形成的胶原中发现的交联剂。由于骨骼持续地被破坏以及改造,ICTP在全身都能找到。然而,在骨转移发生的位置,其水平将显著的高于在正常骨骼的区域。ICTP的高水平发现于前列腺、肺脏以及乳腺癌引起的骨转移中。另一种胶原交联剂,I型氨基末端肽(NTx),在骨转换时与ICTP一同产生。在很多种不同癌症包括肺脏、前列腺以及乳腺癌引起的骨转移中,NTx的量是上升的。并且,NTx水平的上升伴随着骨转移的发展进程。因此,这个标记可用于检测骨转移以及衡量疾病的程度。其它的吸收标记包括吡啶醚和脱氧吡啶醚。吸收标记以及骨转移标记的任何增长表明了患者需要activin-ActRIIa拮抗剂的治疗。

[0183] Activin-ActRIIa拮抗剂可与其它药物制剂联合施用。联合施用可通过单一的复合配方、通过同时施用或间隔时间施用来完成。Activin-ActRIIa拮抗剂如果与其它的骨骼激活剂一同施用,会有特别的优点。患者可从activin-ActRIIa拮抗剂与摄取补钙剂、维生素D、适宜的锻炼和/或(某些情况下)其它的药物联合施用中受益。其它的药物的例子包括,双膦酸盐(阿仑膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠)、降钙素、雌激素、甲状旁腺素以及雷洛昔芬。双膦酸盐(阿仑膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠)、降钙素、雌激素、甲状旁腺素以及雷洛昔芬影响骨骼重构周期并被归类为抗吸收药物。骨骼重构由两个不同的阶段:骨骼吸收和骨骼形成。抗吸收药物减缓或停滞骨骼重构周期的骨骼吸收部分但不减缓周期的骨骼形成部分。结果是,新的形成速率持续大于吸收速率,骨骼密度一直增加。甲状旁腺素片段,甲状旁腺激素的一种形式,其增加骨骼重构循环中的骨骼形成速率。阿仑膦酸钠已被认可用于绝经后的骨质疏松的预防(5毫克每天或每周一次35毫克)和治疗(10毫克每天或每周一次70毫克)。阿仑膦酸钠减少骨丢失,增加骨密度以及降低脊柱、腕和髌的骨折风险。阿仑膦酸钠还被认可用于治疗男性和女性中的作为长期应用这些药物(即强的松和可的松)所导致的糖皮质激素诱导的骨质疏松以及用于男性中的骨质疏松的治疗。阿仑膦酸钠加上维生素D被认可用于治疗女性的绝经后的骨质疏松(每周一次70毫克,加上维生素D),并用于治疗以改善患有骨质疏松的男性的骨量。伊班膦酸钠被认可用于预防和治疗绝经后的骨质疏松。每月服用一次(150毫克),伊班膦酸钠必须在每月的同一天服用。伊班膦酸钠减少骨丢失,增加骨密度以及减少脊柱骨折的风险。利塞膦酸钠被认可用于预防和治疗绝经后的骨质疏松。每天服用(5毫克的剂量)或每周服用(35毫克剂量或35毫克剂量加上钙),利塞膦酸钠减缓骨丢失,增加骨骼密度以及减少脊柱骨折和非脊柱骨折的风险。利塞膦酸钠还被认可用于男性和女性以预防和/或治疗长期施用这些药物(即强的松和可的松)所导致的糖皮质激素诱导的骨质疏松。降钙素是一种天然存在涉及钙调节和骨骼新陈代谢的激素。在绝经期5年以后的女性,降钙素减缓骨丢失,增加脊柱骨密度并可能减轻骨折相关的疼痛。降钙素减少脊柱骨折的风险。降钙素可作为注射剂(50-100IU每天)或鼻喷入(200IU每天)使用。雌激素治疗(ET)/荷尔蒙治疗(HT)被认可用于预防骨

质疏松。ET 如所显示的那样减少骨丢失,增加脊柱和髌的骨骼密度,并减少绝经后的女性的髌和脊柱骨折的风险。ET 施用最常见是以药丸或皮肤贴剂的形式,其释放约 0.3 毫克每天的低剂量或约 0.625 毫克每天的标准剂量,并且即使 70 岁之后才开始也仍然有效。当单独摄入雌激素时,其可增加女性发展宫颈壁癌症(子宫内膜癌)的风险。为消除这种风险,医疗服务提供者开出的处方是孕酮荷尔蒙与雌激素组合用于那些具有完整子宫的女性。ET/HT 减轻绝经期症状并显示对骨骼健康具有有益效果。副作用包括阴道流血、乳房触痛、情绪扰动以及胆囊疾病。雷洛昔芬,60 毫克每天,被认可用于预防和治疗绝经后的骨质疏松。它来源于一系列的叫作选择性雌激素受体调节剂(SERMs)的药物,其被发展成为提供雌激素的有益效果而没有潜在的缺陷。雷洛昔芬增加骨量并且减少脊柱骨折的风险。仍未获得数据以证明雷洛昔芬可以减少髌和非其它非脊柱骨折的风险。这种药物刺激新骨骼的形成并且显著地增加骨矿密度。在绝经后的女性中,脊柱、髌、足、肋骨以及腕的骨折复位是显著的。男性中,脊柱中的骨折复位是显著的,但没有足够的数据来评估其它位置的骨折复位。甲状旁腺素片段是自施用的,如同一天 24 小时注射一样。

[0184] 7. 药物组合物

[0185] 在某些实施方式中,本发明的 activin-ActRIIa 拮抗剂(例如,ActRIIa 多肽)与药学上可接受的载体配方。例如,ActRIIa 多肽可单独施用或作为制剂配方(治疗组合物)的成分。目标化合物可以任何适于应用于人类或兽医的途径配方施用。

[0186] 在某些实施方式中,本发明的治疗方法包括全身性地施用组合物或作为种植体或设备局部施用。施用时,用于本发明的治疗组合物理所当然是无热原的、生理学上可接受的形式。除 ActRIIa 拮抗剂之外的治疗有效药剂可视情况地包括入上面所描述的组合物,在本发明的方法中其可与目标化合物(例如,ActRIIa 多肽)同时或相继地施用。

[0187] 通常地,ActRIIa 拮抗剂在肠胃外施用。适合胃肠外给药的药物组合物包括一个或多个 ActRIIa 多肽与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶剂、分散剂、悬液或乳剂、或可重组到前面所用的无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末相组合,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抗菌剂、赋予配方与将来的受者的血液等张的溶质或悬浮或增稠的药物。合适的应用于本发明的药物组合物的水载体或非水载体的例子包括水、乙醇、多羟基化合物(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇,等等)及其合适的混合物,植物油(诸如橄榄油),以及可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。可保持适当的流动性,例如,通过应用包被物质(诸如卵磷脂),在分散体的情况下通过保持所要求的颗粒大小,以及通过应用表面活性剂。

[0188] 此外,组合物可被装入胶囊或注射为释放至靶组织位置(例如,骨骼)的形式。在某些实施方式中,本发明的组合物包括可以释放一种或多种治疗化合物(例如 ActRIIa 多肽)至靶组织位置(例如,骨骼)的基质,为发育中的组织提供一种结构并且,最理想地,能被吸收入体内。例如,基质可提供 ActRIIa 多肽的缓慢释放。这样的基质可由现有的用于其它植入医药应用的物质形成。

[0189] 基质物质的选择基于生物适应度、生物降解能力、机械特性、外观以及界面特性。目标组合物的特定应用将确定适宜的配方。潜在的用于组合物的基质是生物可降解的以及化学上清楚的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸以及聚酸酐。其它潜在的物质是生物可降解的并且生物学上非常清楚的,诸如骨骼或真皮胶原。其它的基质包括纯蛋白或细胞外基质成分。其它潜在的基质是非生物可降解的以及化学上清楚的,诸如烧结的羟基磷

灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可由上面所提到的任何类型的物质的组合（诸如聚乳酸和羟基磷灰石或胶原和磷酸三钙）组成。生物陶瓷可在组合物中改变，诸如在钙-铝-磷酸中以及在改变孔径、颗粒大小、颗粒形状以及生物降解能力的处理中。

[0190] 在某些实施方式中，本发明的方法可以是口服给药，例如，以胶囊、cathets、药丸、药片、含片（采用调味基质，通常是蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶）、粉末、颗粒或作为水或非水溶剂中的溶液或悬浊液、或作为油包水或作为水包油的液体乳剂、或作为酞剂或糖浆剂、或作为锭剂（采用惰性基质，诸如凝胶和甘油，或蔗糖和阿拉伯树胶）和 / 或漱口剂等的形式，每种都包含预先确定量的作为活性成分的药剂。药剂也可作为丸剂、冲剂或糊剂的形式施用。

[0191] 在口服给药的固态剂量形式（胶囊、药片、药丸、糖衣丸、粉末、颗粒等等）中，本发明的一种或多种治疗化合物可与一种或多种药学上可接受的载体（诸如柠檬酸钠或磷酸二钙）混合，和 / 或任何的下面的物质：(1) 填料或稀释剂，诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸；(2) 粘合剂，诸如，例如，甲基纤维素、藻酸盐、凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯树胶；(3) 保湿剂，诸如甘油；(4) 崩解剂，诸如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐、以及碳酸钠；(5) 溶液缓释剂，诸如石蜡；(6) 吸收促进剂，诸如季胺化合物；(7) 润湿剂，诸如，例如，十六醇以及甘油单硬脂酸酯；(8) 吸收剂，诸如高岭土和膨润土；(9) 滑润剂，诸如滑石、硬脂酸钙、应制酸镁和固体聚乙二醇、硫酸十二烷基钠及其混合物；(10) 着色剂。在胶囊剂、药片以及药丸的情况下，药物组合物可包含缓冲药剂。相似类型的固态组合物也可用于使用诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等等作为辅料的软填充以及硬填充明胶胶囊的填料。

[0192] 用于口服给药的液态剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、糖浆和酞剂。除活性成分外，液态剂型包含本领域常用的惰性稀释剂（诸如水或其它溶剂）、助溶剂和乳化剂（诸如酒精、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯丙醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油（特别地，棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻以及芝麻油）、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇以及山梨聚糖的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂外，口服组合物还包括诸如润湿剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、香料、着色剂、加香以及防腐剂的助剂。

[0193] 悬浮剂，除了活性化合物外，包含诸如乙氧基异硬脂醇 (ethoxylated isostearyl alcohols)、聚氧乙烯山梨醇以及脱水山梨糖醇、微晶纤维素、偏氢氧化铝 (aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂-琼脂和黄芪胶及其混合物的助悬剂。

[0194] 本发明组合物还可包含助剂，诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗菌药和抗真菌药（例如，帕拉胶、氯丁醇、苯酚等等）来确保微生物活动的防止。必要的时候组合物中还包括等渗剂，诸如糖、氯化钠等等。此外，可注射药物的延长吸收可通过延迟吸收的药剂诸如单硬脂酸铝和凝胶的夹杂而带来。

[0195] 当然，给药方案经过主治医师考虑各种改变本发明的目标化合物（例如，ActRIIa 多肽）作用的因素后作出。所述的各种因素包括但不限于，需要形成的骨骼重量，骨密度丢失的程度，骨损伤的位置，损伤骨骼的状况，患者的年龄、性别和饮食，任何促进骨丢失的疾病的严重程度、施用时间以及其它临床因素。视情况，剂量可根据重建中使用的基质类型以及组合物中的化合物类型而变动。其它加到最终的组合物当中的已知的生长因子也可影响剂量。进程可通过骨骼生长和 / 或修复的定期评估（例如，X 射线（包括 DEXA）、组织形态

测定以及四环素标记)来监测。

[0196] 小鼠实验证明了当化合物每次间隔给药而且剂量足够达到 0.2 微克/千克或更高的血药浓度时,ActRIIa-Fc 在骨骼上的效果是可检测的,并且血清药物水平为 1 微克/千克或 2 微克/千克或更高是获得骨骼密度和强度的显著效果所必须的。尽管没有更高剂量的 ActRIIa-Fc 由于会导致副作用而不合需要的迹象,治疗方案被设计为达到 0.2 与 15 微克/千克之间的血药浓度,视情况为 1 到 5 微克/千克之间。在人类中,0.2 微克/千克的血清药物水平可通过 0.1 毫克/千克或更高的单次剂量达到,1 微克/千克的血清药物水平可通过 0.3 毫克/千克或更高的单次剂量达到。观察到的分子的血清半衰期在约 20 天到 30 天之间,大体上长于大多数的 Fc 融合蛋白,并因此获得持久有效的血清药物水平,例如,通过每周或双周基础上的 0.2-0.4 毫克/千克的剂量,或更高的剂量与剂量间更长的时间间隔。例如,1-3 毫克/千克的剂量可用于每月或双月基础上,并且骨骼上的效果足够持久,这样的剂量对于仅仅是每 3、4、5、6、9、12 或更多个月一次所必须的。

[0197] 在某些实施方式中,本发明还提供了体内产生 ActRIIa 多肽的基因疗法。这样的疗法可通过在患有上面所列的疾病的细胞或组织中引入 ActRIIa 多核苷酸序列而达到其治疗效果。ActRIIa 多核苷酸序列的递送可通过使用重组表达载体诸如嵌合病毒或胶态分散体系来完成。优选用于 ActRIIa 多核苷酸序列治疗性递送的是靶向脂质体的使用。

[0198] 本发明所教导的各种可用于利用来基因治疗的病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘,或优选地, RNA 病毒诸如逆转录病毒。优选地,逆转录病毒载体是小鼠或鸟类逆转录病毒的衍生物。可插入单个外源基因的逆转录病毒的例子包括但不限于:莫洛尼小鼠白血病病毒 (MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒 (HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒 (MuMTV) 以及劳斯肉瘤病毒 (RSV)。大量其它的逆转录病毒可合并多个基因。所有这些载体可转移或合并基因以选择性标记使得转导的细胞可被鉴定和生成。逆转录病毒载体可通过粘附例如糖、糖脂或蛋白质而制成靶特异性的。优选靶向通过采用抗体达到。本领域技术人员可意识到特异的多核苷酸序列可插入到逆转录病毒基因组或粘附到病毒包膜蛋白以允许包含 ActRIIa 多核苷酸的逆转录病毒载体靶特异性地递送。在一个优选的实施方式中,载体靶向骨骼或软骨。

[0199] 或者,组织结构细胞可通过常规的钙磷酸盐转染直接以编码逆转录病毒结构基因 gag、pol 和 env 的质粒转染。然后这些细胞以包含感兴趣的基因的载体质粒转染。得到的细胞释放逆转录病毒载体至培养基中。

[0200] 另一个 ActRIIa 多核苷酸靶向释放系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠子以及脂质体系统包括油包水乳剂、胶束、混合胶束以及脂质体。本发明优选的胶体分散系统是脂质体。脂质体是人工膜囊泡,其可有效地作为体外或体内的分散载体。RNA、DNA 以及完整的病毒颗粒可与内部水溶液一同封装,并以生物活性形式分散质细胞(参见,例如,Fraley,等, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。采用脂质体载体高效转染基因的方法是本领域公知的,参见例如, Mannino, 等, Biotechniques, 6:682, 1988。脂质体组合物通常是磷脂的组合,通常与类固醇特别是胆固醇组合。也可以使用其它的磷酸酯或其它的脂质。脂质体的物理特性依赖于 pH、离子强度以及二价阳离子的存在。

[0201] 可用于生产脂质体的脂质的例子包括磷脂酰化合物,诸如磷脂酰甘油、卵磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、脑苷脂和神经节苷脂。示例性的磷脂的例子包括蛋黄

卵磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向也可能基于,例如,器官特异性、细胞特异性以及细胞器特异性以及本领域已知的其它。

实施例

[0202] 本发明在这里是一般性的描述,通过参照下述实施例将更容易理解,所包括的实施例仅仅用于解释某些实施方式以及本发明的某些实施方式,并不打算用于限制本发明。

[0203] 实施例 1 :ActRIIa-Fc 融合蛋白

[0204] 申请人构建了具有融合至人或小鼠 Fc 结构域的人 ActRIIa 胞外结构域的可溶性 ActRIIa 融合蛋白,两者间有最小限度的连接子。构建物分别指的是 ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc。

[0205] 纯化自 CHO 细胞系的 ActRIIa-hFc (SEQ ID NO :7) 如下 :

[0206] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI

[0207] EIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEV

[0208] TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV

[0209] TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVL

[0210] HODWLNKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGPOPREPOVYTLPPSREEMTK

[0211] NOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFCFSVMH
EALHNHYTOKLSLSPGK

[0212] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 蛋白表达在 CHO 细胞系中。考虑了三种不同的前导序列 :

[0213] (i) 蜜蜂蜂毒肽 (HBML) :MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO :8)

[0214] (ii) 组织型纤溶酶原激活物 (TPA) :MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO :9)

[0215] (iii) 天然的 :MGAAKL AFAVFLISCS SGA (SEQ ID NO :10)

[0216] 所选择的形式采用 TPA 前导并具有以下未被加工的氨基酸序列 :

[0217] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQT

[0218] GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI EIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKD

[0219] SPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPA

[0220] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

[0221] VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIE

[0222] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

[0223] QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKLSLSPGK (SEQ ID NO :13)

[0224] 该肽由下面的核苷酸序列所编码 :

[0225] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAG

[0226] CAGTCTTCGTTTCGCCCCGCGCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAG

[0227] GAGTGTCTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAAC

[0228] TGGTGTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTG

[0229] CTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTT

[0230] GGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAA

[0231] AGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATG
[0232] AAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAAAT
[0233] CCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAATCACACATGCCAC
[0234] CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
[0235] CCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACAT
[0236] GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
[0237] GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
[0238] GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
[0239] CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
[0240] AAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
[0241] GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATG
[0242] ACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
[0243] GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACCT
[0244] ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAT
[0245] AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
[0246] CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGT
AAATGAGAATTC(SEQ ID NO :14)

[0247] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 都显著性地顺应重组表达。如图 1 所示,蛋白质纯化成为单一的良好蛋白峰形。N 末端测序揭示了 ILGRSETQE(SEQ ID NO :11) 的单一序列。纯化可通过一系列的柱层析步骤达到,包括,例如,三个或多个以下的步骤,以任意的顺序: A 蛋白层析、Q 琼脂糖层析、苯基琼脂糖层析、尺寸阻排层析以及阳离子交换层析。纯化可通过病毒过滤以及缓冲交换而完成。ActRIIa-hFc 蛋白纯化至以尺寸阻排层析确定大于 98% 而以 SDS PAGE 确定大于 95% 的纯度。

[0248] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 显示了与配体特别是 activinA 的高亲和性。GDF-11 或 ActivinA(“ACA”) 采用标准的氨基酸耦联程序固定在 Biacore CM5 芯片上。ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 蛋白加载至系统,并测量其结合。ActRIIa-hFc 以 5×10^{-12} 的解离常数 (K_D) 结合至 activin,而蛋白质以 9.96×10^{-9} 的 K_D 结合至 GDF11。参见图 2。ActRIIa-mFc 的情况类似。

[0249] A-204 报告基因分析通过 GDF-11 和 ActivinA 来评估 ActRIIa-hFc 蛋白在信号传递上的效果。细胞系:人横纹肌肉瘤(来源于肌肉)。报告载体:pGL3(CAGA)12(Described in Dennler 等,1998,EMBO17 :3091-3100。)参见图 3。CAGA12 基序存在于 TGF-beta 反应性基因(PAI-1 基因),因此这个载体通常用于通过 Smad2 和 3 的信号因子。

[0250] 第一天:分离 A-204 细胞入 48 孔板。

[0251] 第二天:A-204 细胞与 $10 \mu\text{g}$ pGL3(CAGA)12 或 pGL3(CAGA)12($10 \mu\text{g}$)+pRLCMV($1 \mu\text{g}$) 和 Eugene 一同转染。

[0252] 第三天:加入因子(稀释入 0.1% BSA 基质)。抑制剂需要在加至细胞前与因子预孵育 1 小时。6 小时,细胞以 PBS 洗涤,并溶解细胞。

[0253] 随后是荧光素酶分析。通常在该方法中,没有任何的抑制剂的存在,ActivinA 显示出刺激约 10 倍的报告基因表达并且 $\text{ED}_{50} \sim 2$ 纳克/毫升。GDF-11:16 倍刺激, $\text{ED}_{50} : \sim$

1.5 纳克 / 毫升。GDF-8 显示类似 GDF-11 的效果。

[0254] 如图 4 中显示的, ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 在皮摩尔浓度下抑制 GDF-8 调节的信号。如图 5 所示, 三种不同的 ActRIIa-hFc 制剂与接近 200pM 的 IC50 一起抑制 GDF-11 信号。

[0255] ActRIIa-hFc 在药代动力学分析中非常稳定。大鼠给药 1mg/kg、3mg/kg 或 10mg/kg 的 ActRIIa-hFc 多肽, 并且蛋白的血浆药物水平在 24、48、72、144 以及 168 小时测量。在一个单独的研究中, 大鼠的给药剂量是 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg。在大鼠中, ActRIIa-hFc 具有 11-14 天的血清半衰期并且药物的循环水平在 2 周后非常高 (11 μ g/ml、110 μ g/ml 或 304 μ g/ml, 分别对于 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg 的起始剂量)。在食蟹猴中, 血浆半衰期基本上大于 14 天并且药物的循环水平是 25 μ g/ml、304 μ g/ml 或 1440 μ g/ml (分别对应于 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg 的起始浓度)。人类中的初步结果显示, 血清药物半衰期在约 20 至 30 天之间。

[0256] 实施例 2 : ActRIIa-hFc 在体内促进骨骼生长

[0257] 正常的雌性小鼠 (BALB/c) 给予 1mg/kg/ 剂、3mg/kg/ 剂或 10mg/kg/ 剂水平的 ActRIIa-mFc, 每周给药 2 次, 骨矿密度和骨矿含量通过 DEXA 确定, 参见图 6。

[0258] 在雌性 BALB/c 中, DEXA 扫描显示作为 ActRIIa-mFc 的治疗结果, 骨矿密度和含量的显著增加 (> 20%)。参见图 7 和 8。

[0259] 因此, ActRIIa 的拮抗剂引起正常雌性小鼠的骨密度和含量的增加。作为后续步骤, 检测了 ActRIIa-mFc 在去除卵巢的小鼠模型上的效果。

[0260] Andersson 等 (2001), 确定去除卵巢的小鼠经受相当的骨丢失 (在术后 6 周大概丢失了 50% 的松质骨), 并且这些小鼠中的骨丢失可通过候选治疗剂诸如甲状旁腺激素治疗。

[0261] 申请人采用 4-5 周龄的去除卵巢的 (OVX) 雌性 C57BL6 小鼠或假手术雌性小鼠。术后 8 周, 开始用 ActRIIa-mFc (10mg/kg, 每周两次) 或对照 (PBS) 来治疗。通过 CT 扫描来衡量骨密度。

[0262] 如图 9 显示的, 在 6 周后, 相对于假手术的小鼠, 未治疗的、去除卵巢的小鼠显示相当的松质骨密度损失。ActRIIa-mFc 处理组保留了假手术组水平的骨密度。在 6 周和 12 周的治疗时, ActRIIa-mFc 引起 OVX 小鼠松质骨相当的增长。参见图 10。在 6 周的治疗后, 相对于 PBS 对照组, 骨密度增加了 24%。在 12 周后, 增加为 27%。

[0263] 在假手术小鼠中, ActRIIa-mFc 也引起了松质骨的相当的增长。参见图 11。在 6 周和 12 周后, 相对于对照, 治疗产生了 35% 的增长。

[0264] 在另外一组实验中, 如上所述的去除卵巢 (OVX) 小鼠或假手术小鼠以 ActRIIa-mFc (10mg/kg, 每周两次) 或对照 (PBS) 处理 12 周以上。类似于上面描述的 ActRIIa-mFc 的结果, 接受 ActRIIa-mFc 的 OVX 小鼠展示松质骨密度早在处理 4 周的时候增加了 15%, 而在 12 周的处理后增加了 15% (图 12)。接受 ActRIIa-mFc 的假手术小鼠同样显示松质骨密度早在处理 4 周的时候增加了 25%, 而在 12 周的处理后增加了 32% (图 13)。

[0265] 在以 ActRIIa-mFc 处理 12 周后, 全身以及间接体内股骨 DEXA 分析显示, 处理在去除卵巢小鼠以及假手术小鼠 (图 14A 和图 14B, 分别地) 中均诱导了骨骼密度的增长。这

些结果也被股骨中段的间接体内 pQCT 分析所支持,其证明了在以 ActRIIa-mFc 处理 12 周后,总骨骼密度以及皮质骨密度均显著上升。载体处理的对照去除卵巢小鼠展示的骨骼密度与载体处理的对照假手术小鼠相比较(图 15)。除骨骼密度之外,骨量也随 ActRIIa-mFc 处理而增加。股骨中段的间接体内 pQCT 分析证明在以 ActRIIa-mFc 处理 12 周后总骨量以及皮质骨量均显著上升,而去除卵巢的小鼠以及假手术的载体对照处理的小鼠均展示了可比较的骨量(图 16)。股骨中段的间接体内 pQCT 分析还显示,ActRIIa-mFc 处理的小鼠没有显示骨膜周长的变化,而 ActRIIa-mFc 处理导致骨内膜周长的减小表明皮质厚度的增加是由股骨内表面的生长引起的(图 17)。股骨的力学测试确定 ActRIIa-mFc 可以增加骨骼的外在特性(最大载荷、刚度以及断裂能),其有助于骨骼内在特性(极限强度)的显著增加。以 ActRIIa-mFc 处理的去除卵巢的小鼠展示了高于假手术的、载体处理的对照水平的增加的骨骼强度,表明骨质疏松表现型的完全逆转(图 18)。

[0266] 这些数据证明 activin-ActRIIa 拮抗剂可在雌性小鼠中增加骨密度,并且,此外,在骨质疏松的小鼠模型中更正骨密度、骨含量以及最大骨骼强度的缺陷。

[0267] 在另一组实验中,小鼠在第 4 周去除卵巢或假手术,在第 12 周开始的时候接受安慰剂或 ActRIIa-mFc (2 次每周,10mg/kg) (如图 19-24 中的 RAP-11),再进行 12 周。评估各种骨骼参数。如图 19 所示,ActRIIa-mFc 增加 OVX 和假手术组的脊椎松质骨容积与总容积的比例(BV/TV)。ActRIIa-mFc 也改善松质骨的结构(图 20),增加骨膜厚度(图 21)以及改善骨骼强度(图 22)。如图 23 所示,ActRIIa-mFc 在从 1mg/kg 到 10mg/kg 的剂量范围内产生令人满意的效果。

[0268] 骨骼的组织形态测量在假手术小鼠的 2 周时间点进行。在图 24 中呈现的这些数据,证明 ActRIIa-mFc 具有双重效果,抑制骨骼吸收以及促进骨骼生长。因此,ActRIIa-mFc 促进骨骼生长(合成代谢效果)以及抑制骨骼吸收(抗分解代谢效果)。

[0269] 实施例 4:替代的 ActRIIa-Fc 蛋白

[0270] 一种替代的构建物可删除 ActRIIa 胞外结构域 C 末端尾(最后的)的 15 个氨基酸。这样的构建物的序列如下:(Fc 部分以下划线标出)(SEQ ID NO:12):

[0271] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI

[0272] EIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMTG

[0273] GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

[0274] KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCK

[0275] VSNKALPVPPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPS

[0276] DIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW00GNVFSCS
VMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

[0277] 参考文献的整合

[0278] 本发明所提到的所有出版物和专利整体地以参考文献的形式并入本发明,如同每个出版物或专利特别地且单独地指示以参考文献并入。

[0279] 尽管已对目标事物的特定实施例进行了讨论,上面的说明书是示例性而且是非限制性的。通过阅读上面的说明书和后面的权利要求,诸多变动对于本领域技术人员来说是明显的。本发明全部的保护范围应当参照权利要求与其相当的保护范围以及说明书与这样的变动来确定。

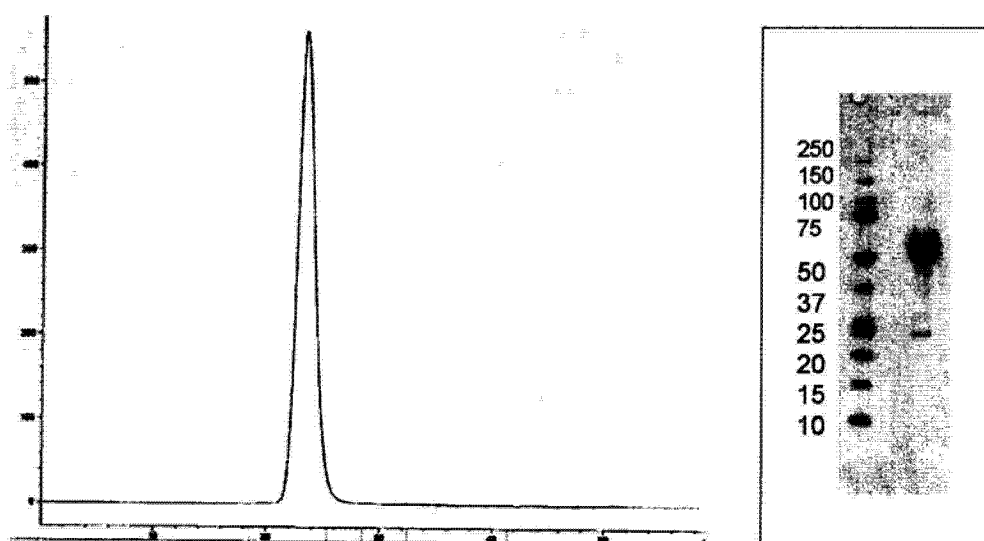


图 1

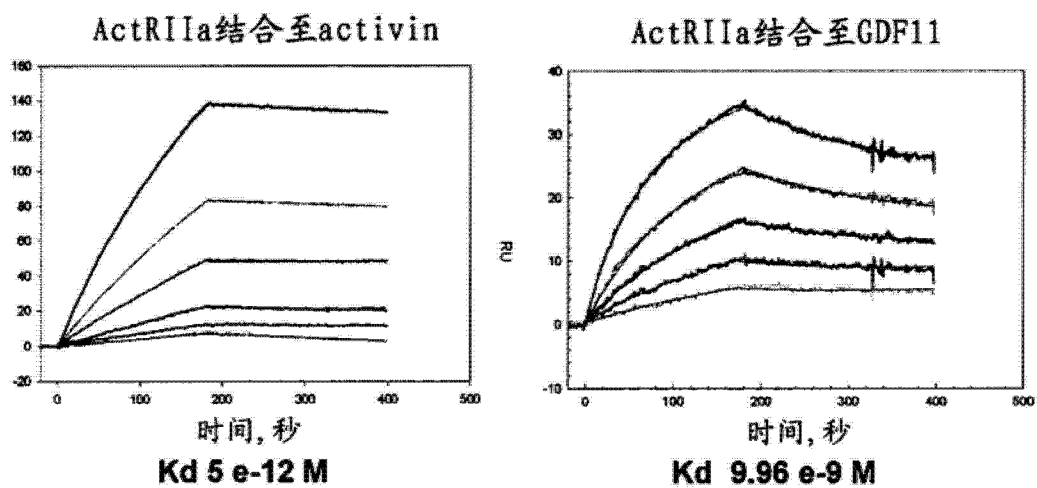


图 2

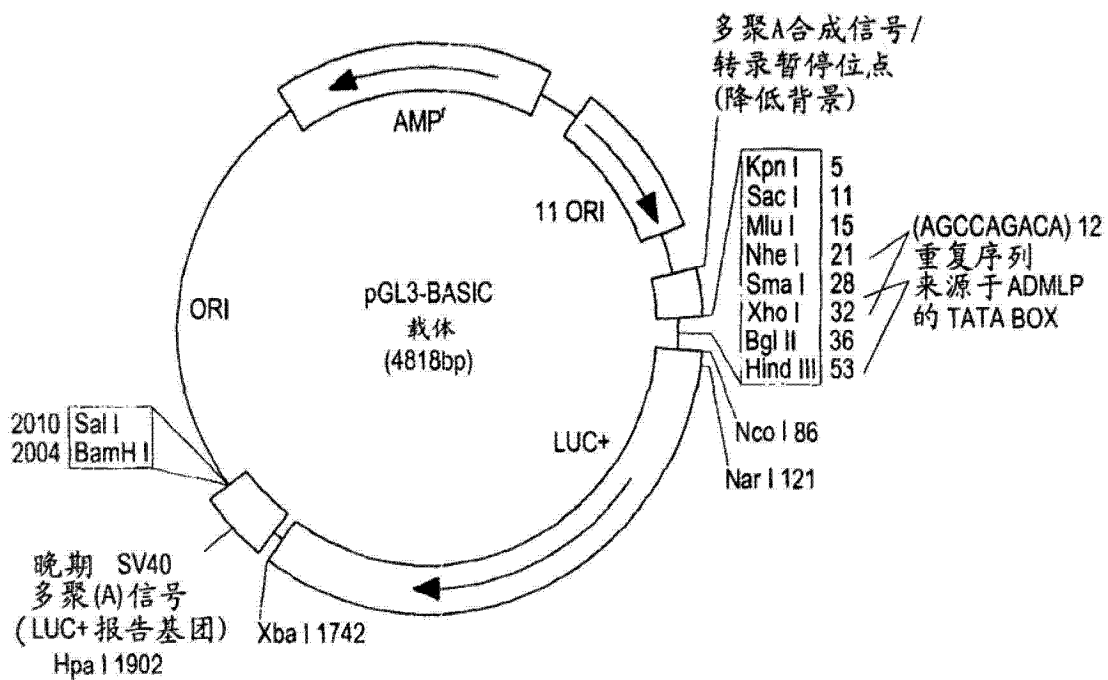


图 3

GDF-8被ActRIIa抑制 (A204细胞)

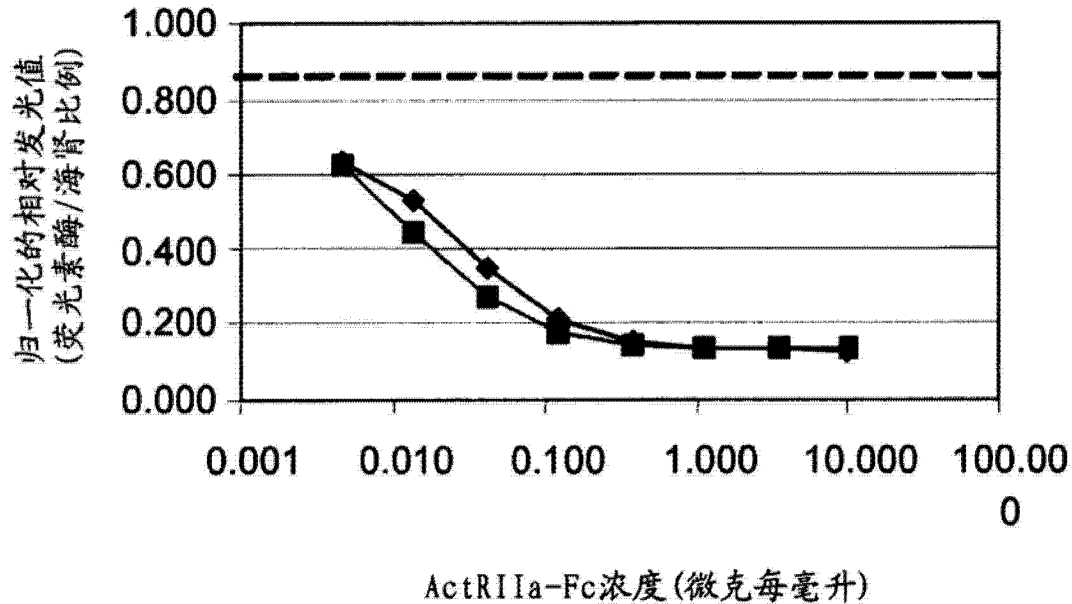


图 4

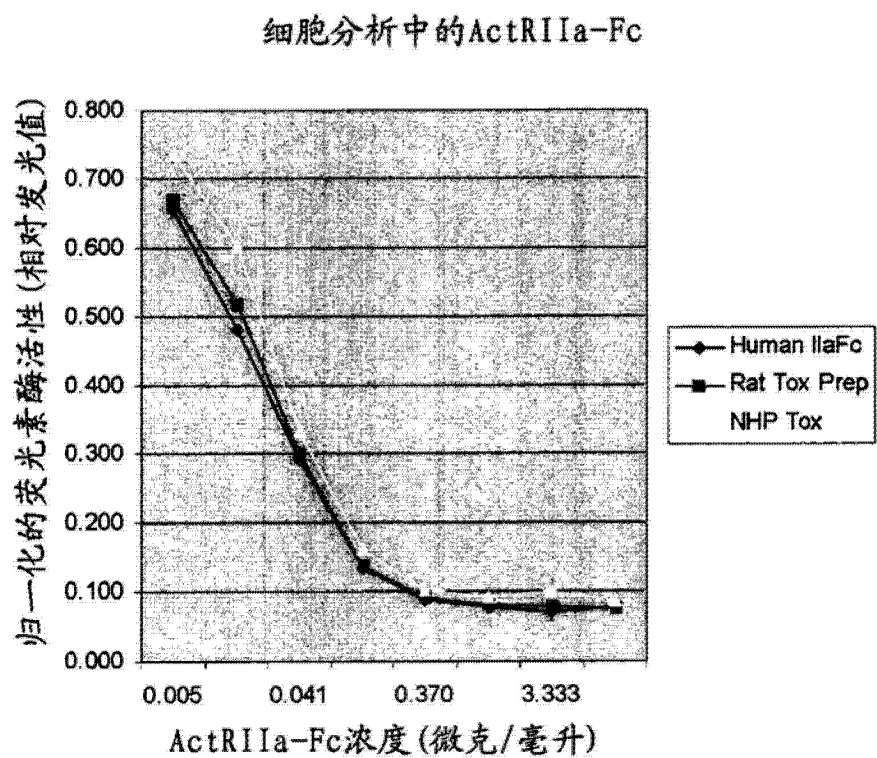


图 5

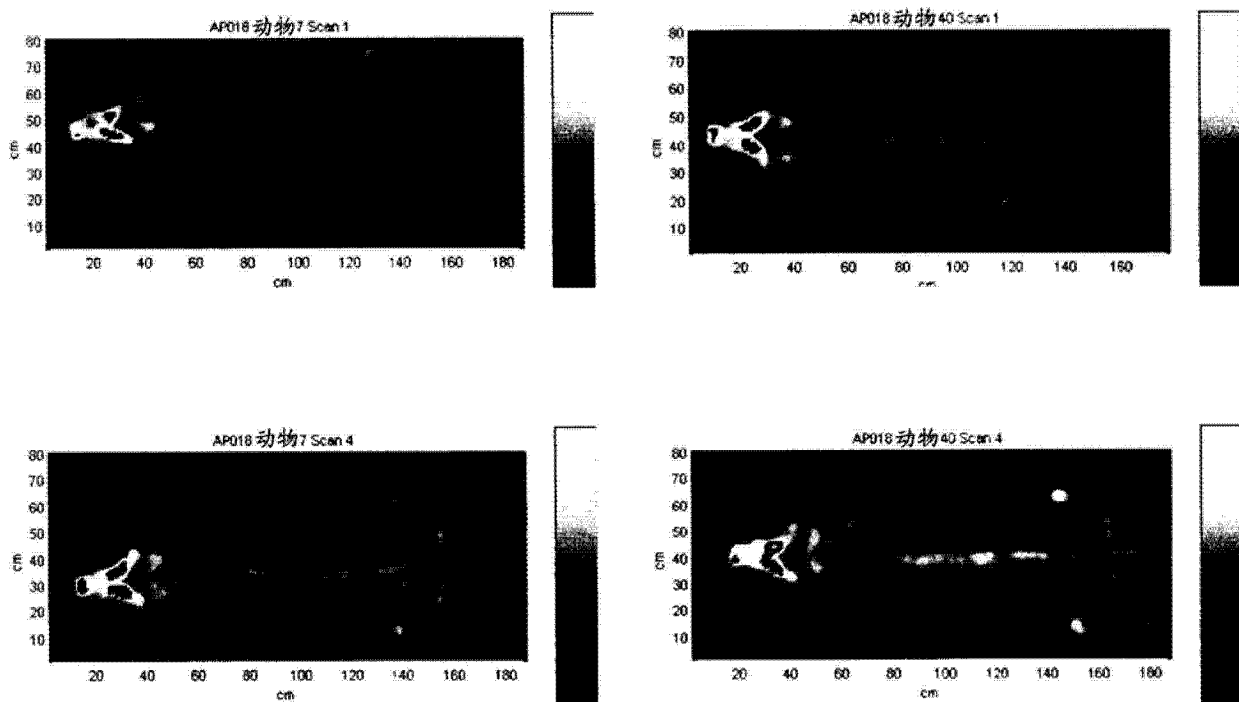


图 6

骨矿密度 (BALB/c雌性)

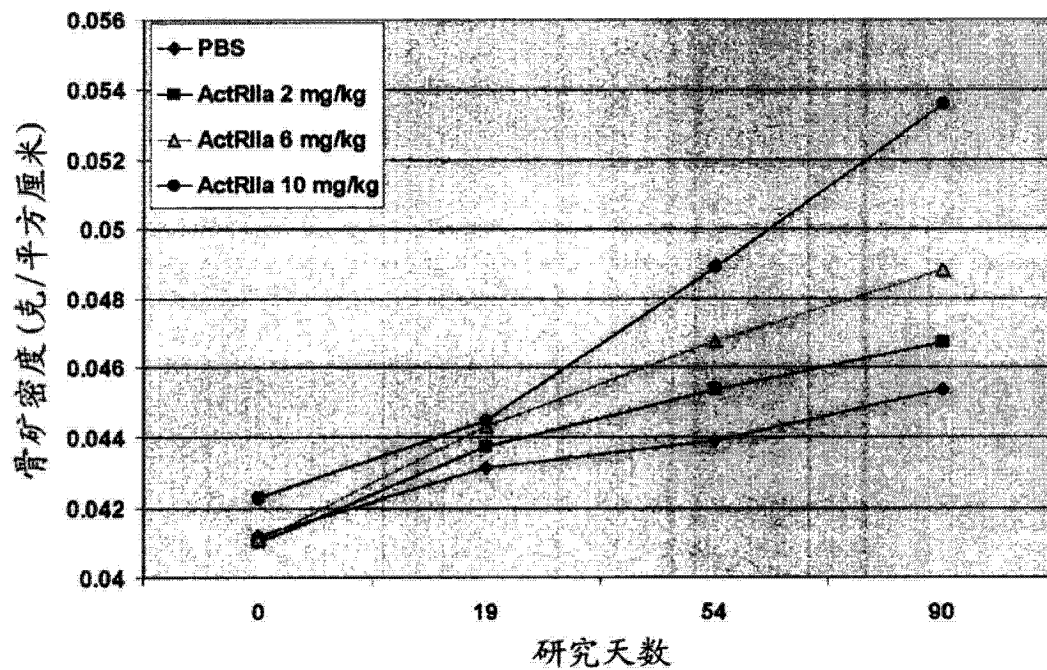


图 7

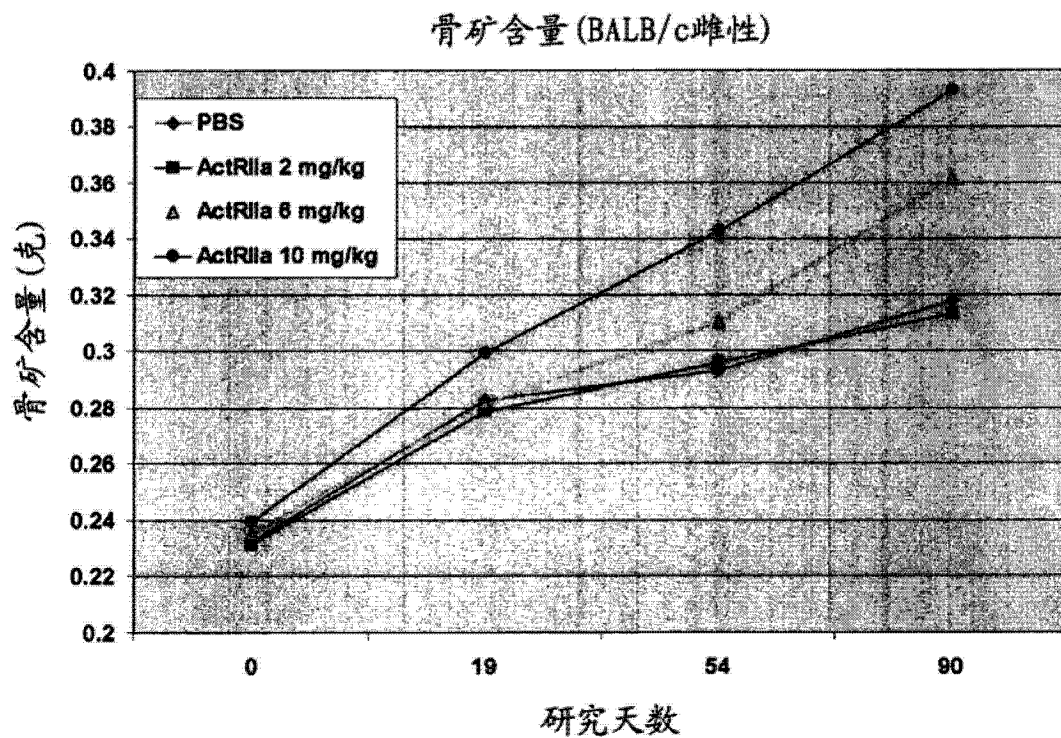


图 8

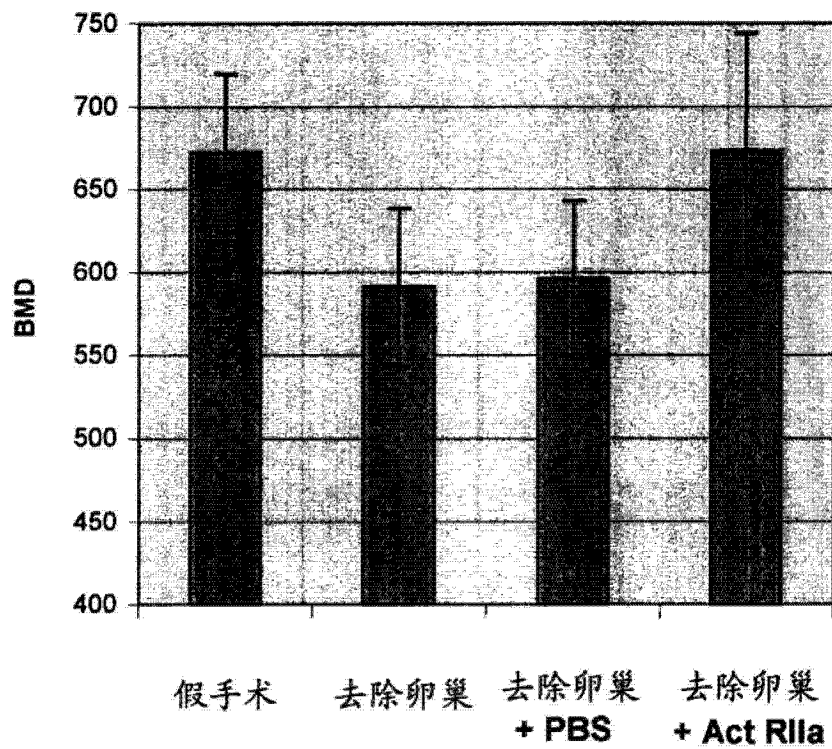


图 9

松质骨(去卵巢的C57BL/6)

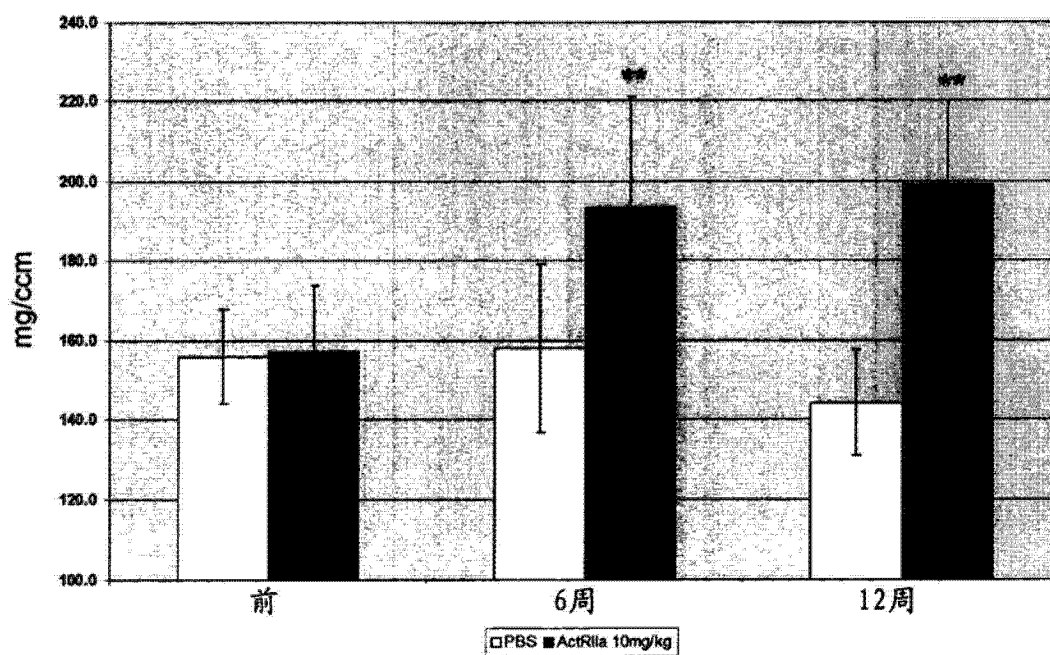


图 10

松质骨(假手术C57BL/6)

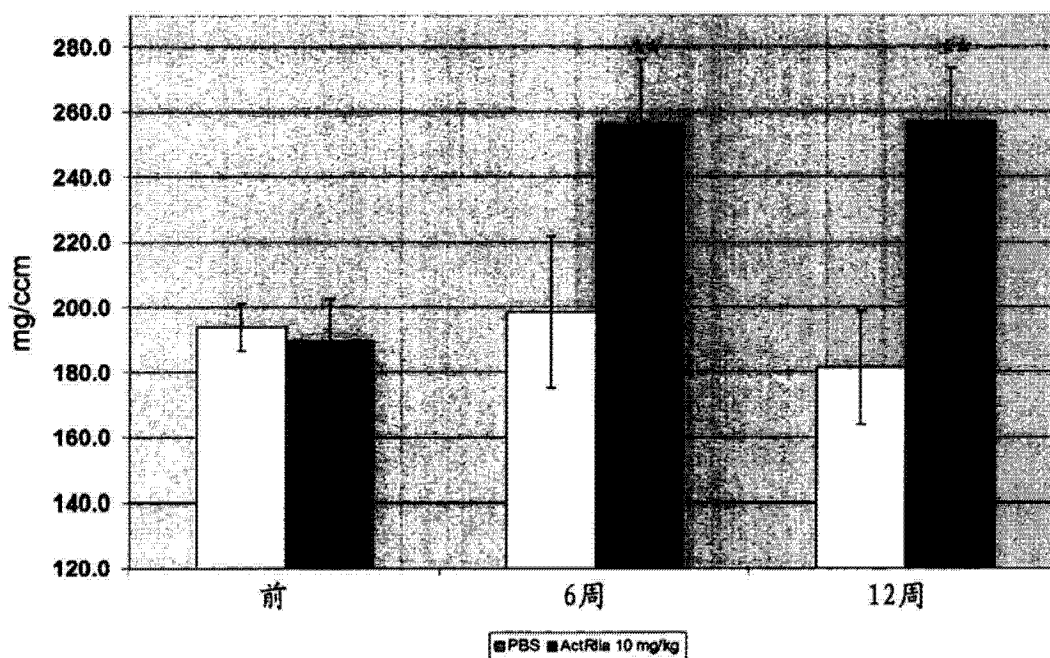


图 11

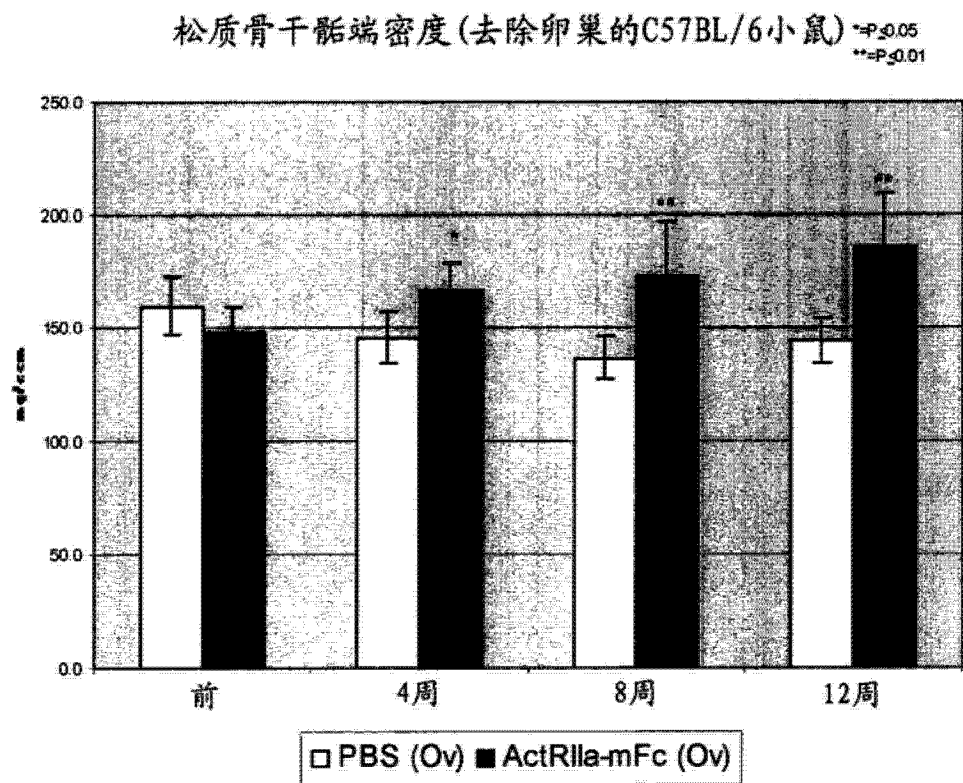


图 12

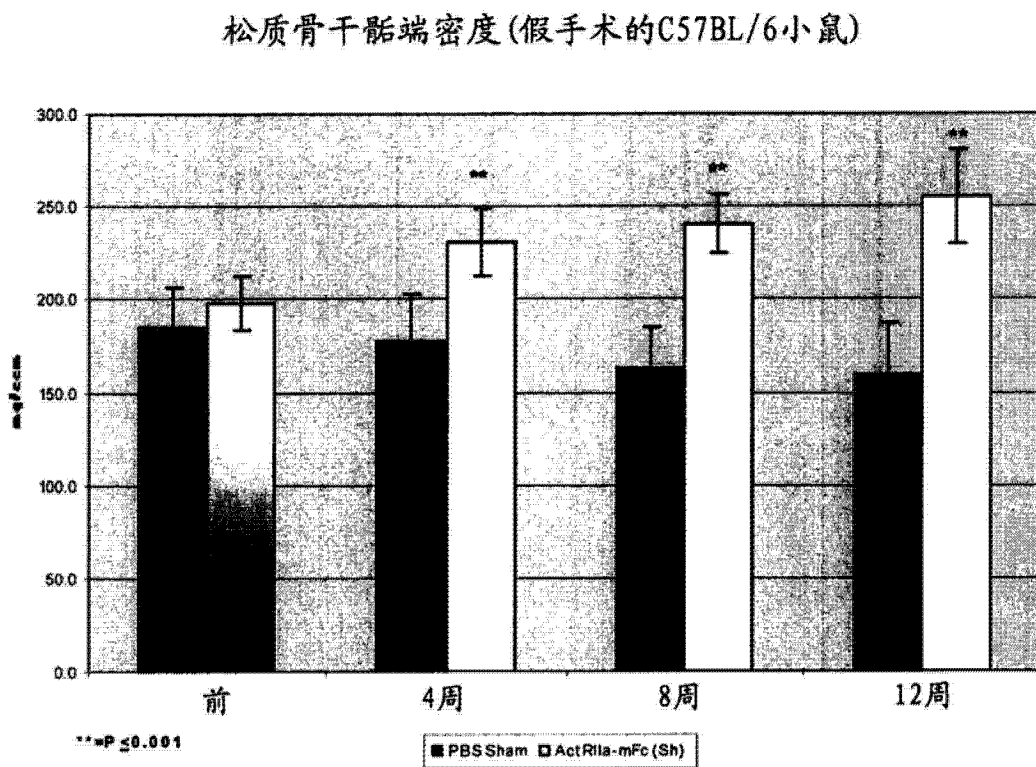


图 13

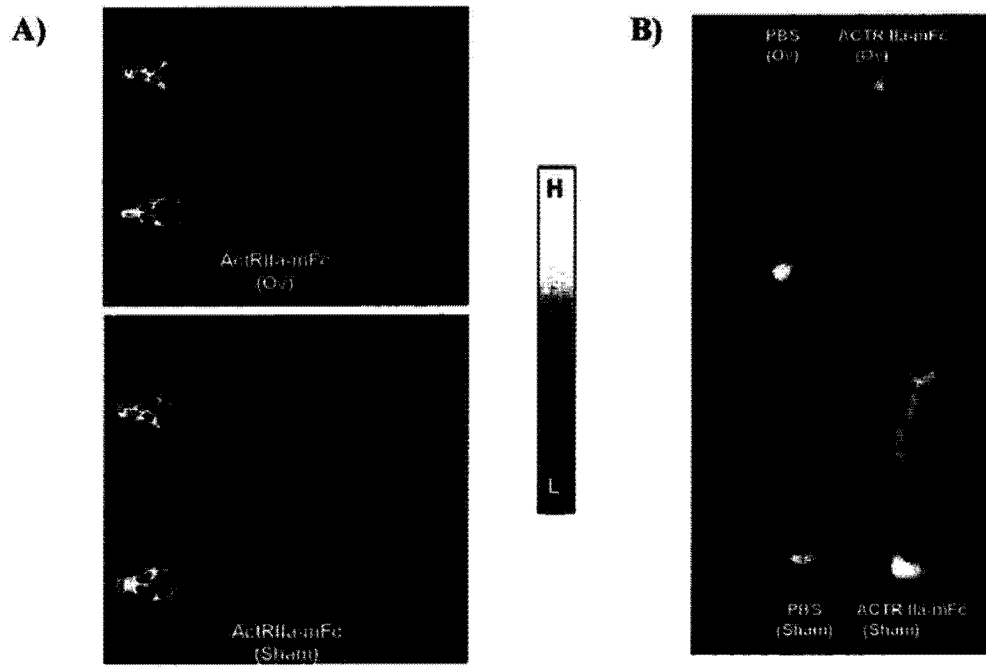


图 14

间接体外的股骨密度

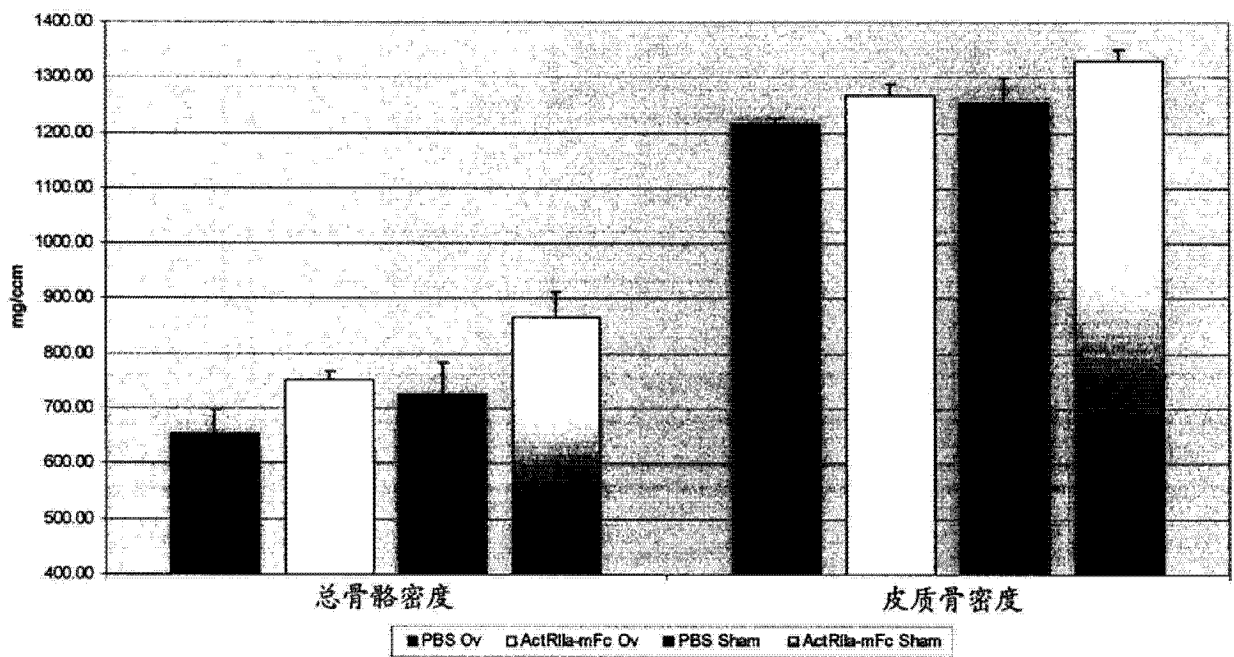


图 15

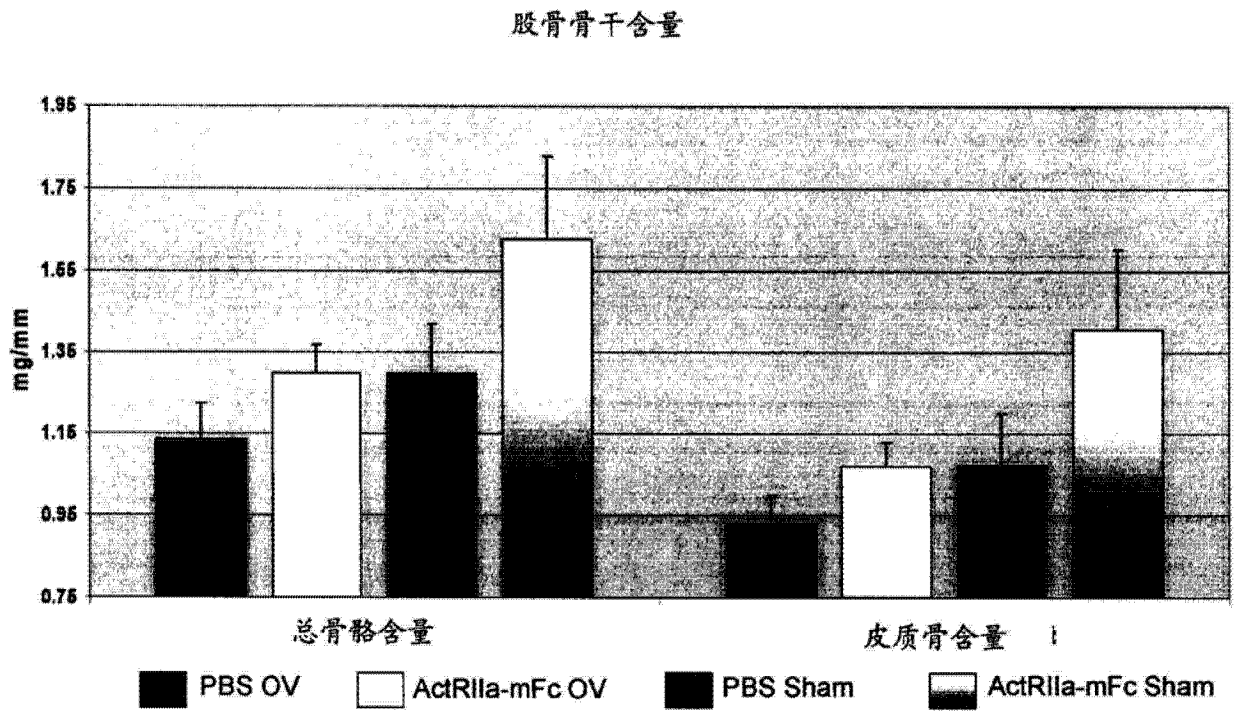


图 16

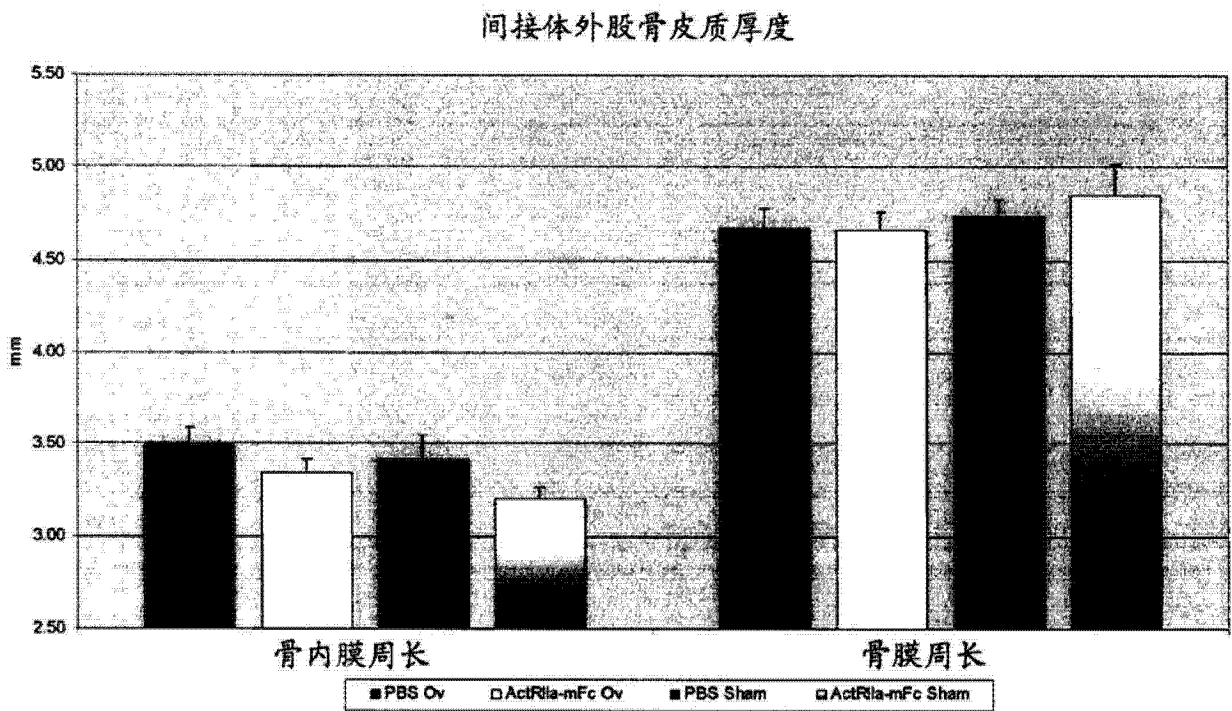


图 17

四点生物力学测试

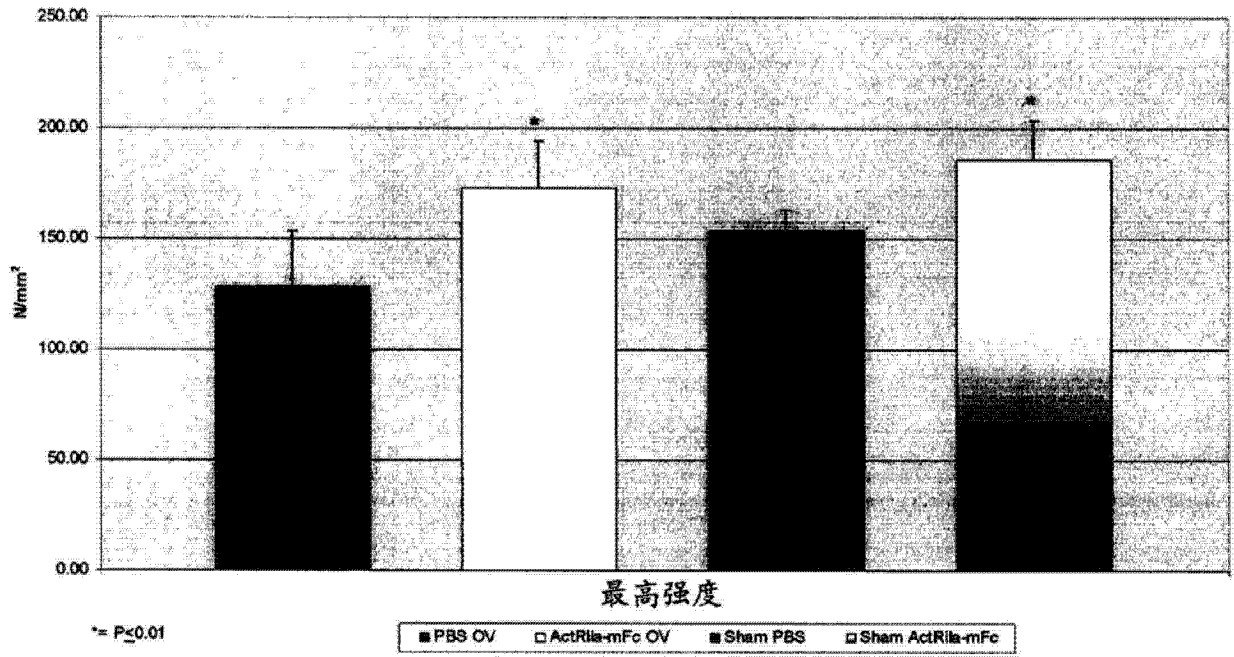
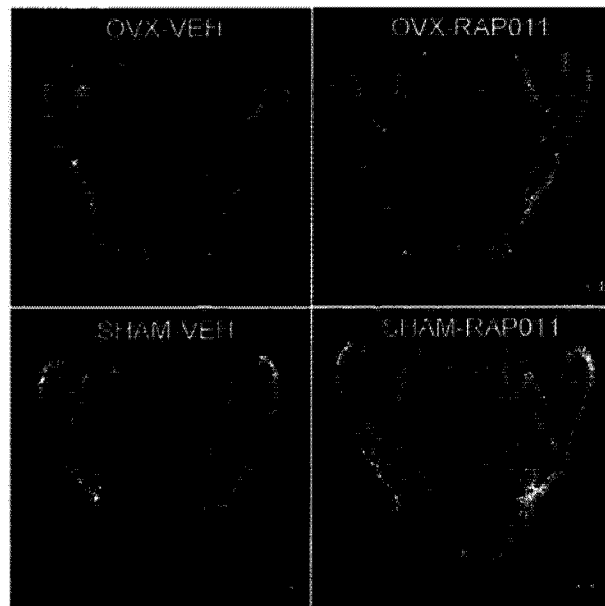
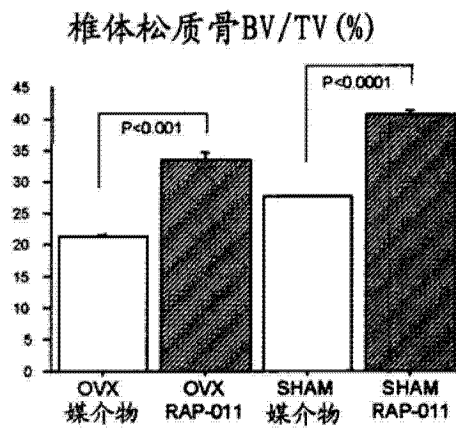
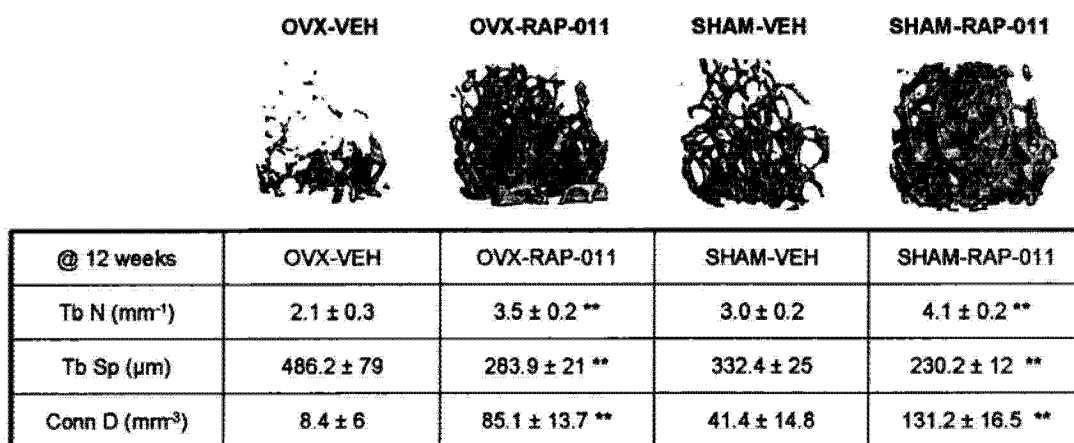


图 18



研究末期的显微CT数据 (24周龄)

图 19



** p < 0.01 vs VEH

图 20

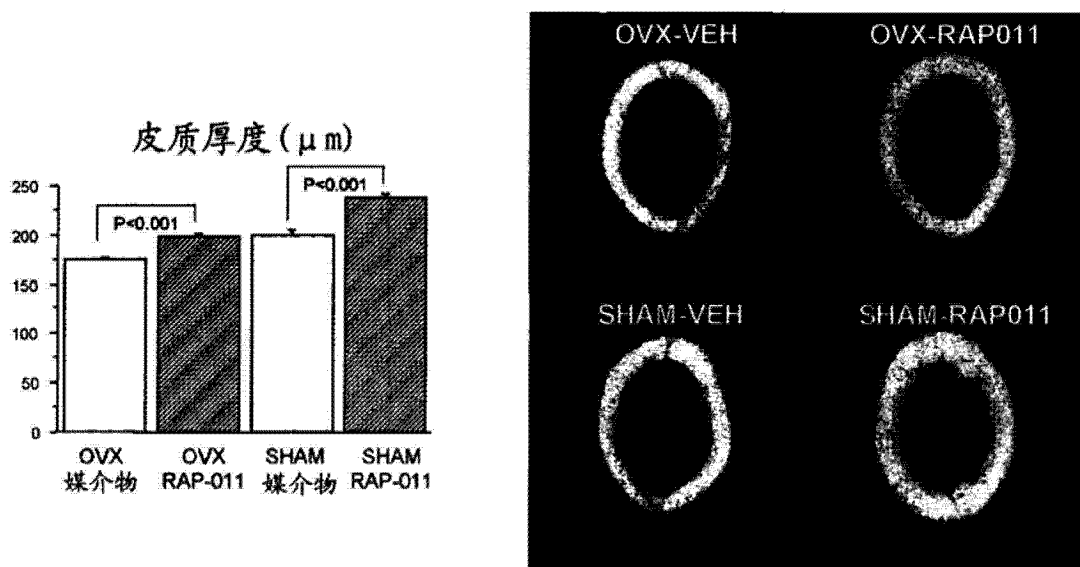


图 21

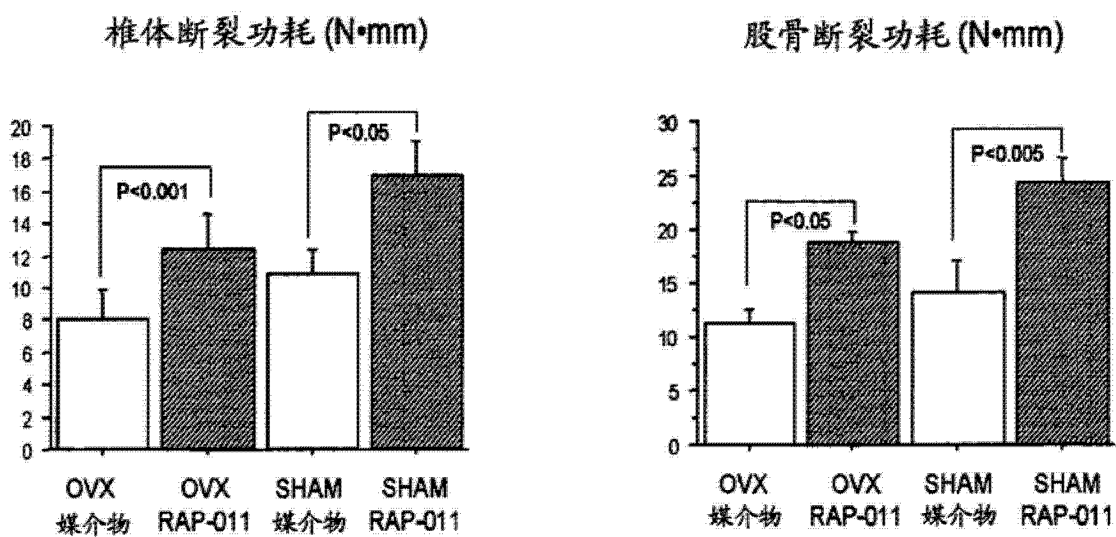


图 22

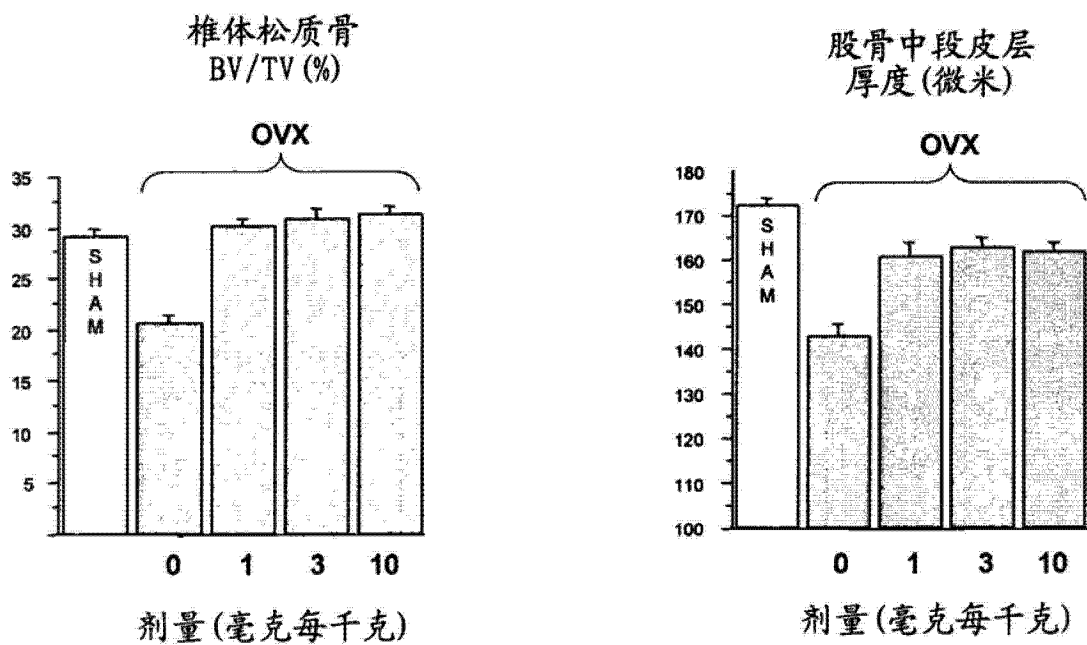


图 23

	BV/TV (百分比)	ES/BS (百分比)	Nob/BPm (每毫米)	Noc/BPm (每毫米)	Ms/Bs (百分比)	MAR (微米每天)	BFR/BSd (立方微米/平方微米/每天)
PBS平均值	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011 平均值	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
P值	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

图 24