



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104189889 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410320444. 3

A61P 19/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 02. 01

A61P 19/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/900580 2007. 02. 09 US

60/932762 2007. 05. 31 US

60/937365 2007. 06. 26 US

61/000528 2007. 10. 25 US

(62) 分案原申请数据

200880011454. 1 2008. 02. 01

(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. 西赫拉 R. 库马

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 李进

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

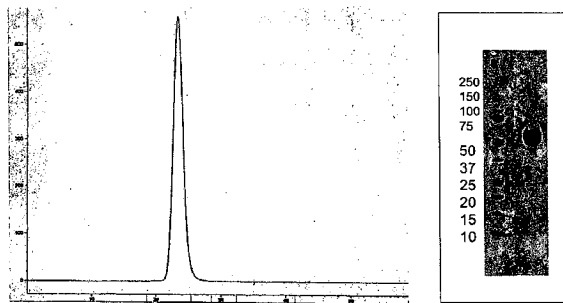
权利要求书4页 说明书33页 附图19页

(54) 发明名称

活化素-ACR11A拮抗剂和促进癌症患者骨骼生长的用途

(57) 摘要

一种活化素-ACR11A拮抗剂和促进癌症患者骨骼生长的用途。在某些方面,本发明提供了促进骨骼生长并增加骨密度,以及治疗多发性骨髓瘤的组合物和方法。



1. 药物组合物,其包含 CHO 细胞表达的 ActRIIa-Fc 融合蛋白,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白是通过二硫键连接的两个 SEQ ID NO:7 的多肽形成的二聚体,条件是所述两个多肽之一或两者比 SEQ ID NO:7 中所示的多肽在氨基或羧基末端少一个氨基酸,并且其中所述二聚体有 3 至 5 个唾液酸部分。

2. 权利要求 1 所述的药物制剂,其中所述二聚体有 4 个唾液酸部分。

3. 权利要求 1 所述的药物制剂,其中当静脉或皮下给药时,所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白在正常健康人中的血清半衰期为平均 25 至 32 天,并具有等同的生物利用度。

4. 权利要求 1 所述的药物制剂,其中所述药物制剂适于皮下给药。

5. 权利要求 1 所述的药物制剂,其中就其他蛋白组分而言,所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白纯度至少为 90%。

6. 治疗或预防人类患者癌症相关骨丢失的方法,所述方法包括将有效量的 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者。

7. 权利要求 6 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白选自:

包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 一致性的氨基酸序列的多肽;

包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90% 一致性的氨基酸序列的多肽;以及

包含 SEQ ID NO:2 的至少 50 个连续的氨基酸的多肽。

8. 权利要求 7 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有一个或多个以下特性:

以至少 10^{-7} M 的 K_D 结合至 ActRIIa 配体;以及

抑制细胞内 ActRIIa 信号传导。

9. 权利要求 6 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包括一个或多个选自以下的修饰氨基酸残基:糖基化的氨基酸、PEG 化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、缀合于脂质部分的氨基酸以及缀合于有机衍生化剂的氨基酸。

10. 权利要求 7 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少 90% 一致性的氨基酸序列。

11. 权利要求 7 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少 95% 一致性的氨基酸序列。

12. 权利要求 7 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。

13. 权利要求 7 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

14. 权利要求 6 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白是两个多肽形成的二聚体,所述两个多肽每个包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 90% 一致性的氨基酸序列,并且其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含三个或多个唾液酸部分。

15. 权利要求 14 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

16. 权利要求 15 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含三个至五个唾液酸部分。

17. 权利要求 6 所述的方法,其中所述方法使所述患者骨骼肌质量有少于 10% 的增加。

18. 权利要求 6 所述的方法,其中施用所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白,从而使所述患者血清

浓度达到至少 200 ng/mL。

19. 权利要求 18 所述的方法,其中施用所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白,从而使所述患者血清浓度达到至少 1000 ng/mL。

20. 权利要求 6 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

21. 权利要求 6 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白在正常健康人中血清半衰期为 15 至 40 天。

22. 权利要求 20 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每周一次。

23. 权利要求 20 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每月一次。

24. 权利要求 20 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过三个月一次。

25. 权利要求 6-24 中任一项所述的方法,其中所述患者正在接受骨抗吸收治疗,或在施用 ActRIIa-Fc 融合蛋白之前一年内已经接受了骨抗吸收治疗。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述抗吸收药物选自双膦酸盐药物、RANK 配体拮抗剂和护骨蛋白拮抗剂。

27. 权利要求 6-24 中任一项所述的方法,其进一步包括将放射治疗、细胞毒药物或化学治疗药物施用于所述患者。

28. 权利要求 6-24 中任一项所述的方法,其中所述患者患有多发性骨髓瘤。

29. 治疗或预防癌症相关骨丢失的方法,所述方法包括将有效量的活化素 ActRIIa 拮抗剂施用于对其有需要的受试者。

30. 权利要求 29 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂是活化素或 ActRIIa 拮抗剂多肽。

31. 权利要求 29 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂是选自下列的抗体:
抗活化素抗体;和
抗 ActRIIa 抗体。

32. 权利要求 29 所述的方法,其中所述受试者患有多发性骨髓瘤。

33. 促进患者骨生长并抑制骨吸收的方法,所述方法包括将有效量的 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白是两个多肽形成的二聚体,所述两个多肽每个包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 90% 一致性的氨基酸序列,并且其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含三个或多个唾液酸部分。

34. 权利要求 33 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

35. 权利要求 34 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 3 至 5 个唾液酸部分。

36. 权利要求 33 所述的方法,其中所述方法使所述患者骨骼肌质量有少于 10% 的增加。

37. 权利要求 33 所述的方法,其中施用所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白,从而使所述患者的血清浓度达到至少 200 ng/mL。

38. 权利要求 33 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

39. 权利要求 33 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白在正常健康人中的血清半衰期为 15 至 40 天。

40. 权利要求 33 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每周一次。

41. 权利要求 33 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每月一次。

42. 权利要求 33 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过三个月一次。

43. 权利要求 33 所述的方法,其中所述患者在施用 ActRIIa-Fc 融合蛋白之前一年内已经接受了抗吸收治疗。

44. 权利要求 33 所述的方法,其中所述患者在施用 ActRIIa-Fc 融合蛋白时,正在接受抗吸收治疗。

45. 权利要求 33 所述的方法,其中所述患者进一步接受抗吸收药物。

46. 权利要求 43-45 中任一项所述的方法,其中所述抗吸收药物是双膦酸盐药物。

47. 权利要求 43-45 中任一项所述的方法,其中所述抗吸收药物是 RANK 配体拮抗剂或护骨蛋白拮抗剂。

48. 治疗或预防人患者多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括将有效量的 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者。

49. 权利要求 48 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白选自:

包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 一致性的氨基酸序列的多肽;

包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90% 一致性的氨基酸序列的多肽;以及

包含 SEQ ID NO:2 的至少 50 个连续的氨基酸的多肽。

50. 权利要求 49 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有一个或多个以下特性:

以至少 10^{-7} M 的 K_D 结合至 ActRIIa 配体;以及

抑制细胞内 ActRIIa 信号传导。

51. 权利要求 48 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包括一个或多个选自以下的修饰氨基酸残基:糖基化的氨基酸、PEG 化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、缀合于脂质部分的氨基酸以及缀合于有机衍生化剂的氨基酸。

52. 权利要求 49 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少 90% 一致性的氨基酸序列。

53. 权利要求 49 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少 95% 一致性的氨基酸序列。

54. 权利要求 49 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。

55. 权利要求 49 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

56. 权利要求 48 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白是两个多肽形成的二聚体,所述两个多肽每个包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 90% 一致性的氨基酸序列,并且其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含三个或多个唾液酸部分。

57. 权利要求 56 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

58. 权利要求 57 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含三个至五个唾液酸部分。

59. 权利要求 48 所述的方法,其中所述方法使所述患者骨骼肌质量有少于 10% 的增加。

60. 权利要求 48 所述的方法,其中施用所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白,从而使所述患者血清浓度达到至少 1000 ng/mL。

61. 权利要求 48 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

62. 权利要求 48 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白在正常健康人中血清半衰期为 15 至 40 天。

63. 权利要求 61 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每周一次。

64. 权利要求 61 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每月一次。

65. 权利要求 61 所述的方法,其中将所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白施用于所述患者的频率不超过每三个月一次。

66. ActRIIa-Fc 融合蛋白在制备用于治疗或预防人类患者癌症相关骨丢失的药物中的用途。

67. 用于治疗或预防人类患者癌症相关骨丢失的 ActRIIa-Fc 融合蛋白。

68. 活化素 -ActRIIa 拮抗剂在制备用于治疗或预防癌症相关骨丢失的药物中的用途。

69. 用于治疗或预防人类患者癌症相关骨丢失的活化素 -ActRIIa 拮抗剂。

70. ActRIIa-Fc 融合蛋白在制备促进患者骨生长并抑制患者骨吸收的药物中的用途,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白是两个多肽形成的二聚体,所述两个多肽每个包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 90% 一致性的氨基酸序列,并且其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 3 个或多个唾液酸部分。

71. 用于促进患者骨骼生长并抑制患者骨吸收的 ActRIIa-Fc 融合蛋白,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白是两个多肽形成的二聚体,所述两个多肽每个包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列有至少 90% 一致性的氨基酸序列,并且其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 3 个或多个唾液酸部分。

72. ActRIIa-Fc 融合蛋白在制备用于治疗或预防人类患者多发性骨髓瘤的药物中的用途。

73. 用于治疗或预防人类患者多发性骨髓瘤的 ActRIIa-Fc 融合蛋白。

活化素 -ACTRIIA 拮抗剂和促进癌症患者骨骼生长的用途

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2008年2月1日,申请号为200880011454.1,发明名称为“活化素 -ACTRIIA 拮抗剂和促进癌症患者骨骼生长的用途”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2007年2月9号提交的美国临时申请序号60/900,580,2007年5月31号提交的美国临时申请序号60/932,762,2007年6月26号提交的美国临时申请序号60/937,365,以及2007年10月25号提交的61/000,528的权益。以上引用申请的所有教导都在此引作参考。

[0004] 发明背景

[0005] 从骨质疏松到骨折的一系列骨骼疾病代表了一组极少有有效药物的病理状态。治疗反而集中在包括固定化、锻炼和饮食改变的物理和行为干涉上。为了治疗各种骨骼疾病,有促进骨骼生长并增加骨骼密度的治疗药物将是有益的。

[0006] 骨骼生长和矿化依赖于破骨细胞和成骨细胞这两种细胞类型的活性,尽管软骨细胞和血管系统细胞也参与了这些过程的关键方面。发育上,骨骼形成通过软骨内成骨和膜内成骨两种机制发生,前者是纵向骨形成的原因,后者是局部解剖学扁平骨如头骨骨骼形成的原因。软骨内成骨要求充当形成成骨细胞、破骨细胞、血管系统的模板的生长板内软骨结构的连续形成和降解以及随后的矿化。在膜内成骨过程中,骨骼在结缔组织中直接形成。这两种过程都要求成骨细胞的浸润和随后的基质沉积。

[0007] 骨折以及骨骼的其他结构性破裂通过至少表面上类似骨生成的发育事件的顺序的过程愈合,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。直接或一级骨骼愈合的发生没有骨痂形成。间接或二级骨骼愈合的发生有骨痂前体阶段。一级骨折愈合涉及跨越(across)紧接在一起的(closely set)破裂的机械连接的重建。在合适的条件下,破裂周围的骨吸收细胞显示隧道吸收反应,并建立血管渗透通路并随后愈合。骨骼的二级愈合按照炎症、软骨痂形成、骨痂矿化和骨痂重建的过程进行。在炎症阶段,血肿和出血形成源于损伤位置的骨外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、成纤维细胞、胞内物质和支持细胞,在骨折碎片间隙形成肉芽组织。跨越(across)破裂的临床愈合由纤维或软骨组织(软骨痂)建立。成骨细胞形成并介导软骨痂的矿化,然后所述软骨痂被板层骨代替并经历正常的重构过程。

[0008] 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量损失可由多种条件引起,并可能导致严重的医学问题。骨量的改变以相对可预测的方式发生于个体整个寿命期间。到大约30岁时,男性和女性的骨骼通过软骨生长板的线性生长和径向生长生长至最大质量。在大约30岁(对于小梁骨(trabecular bone),例如扁骨诸如椎骨和骨盆)和40岁(对于皮质骨(cortical bone),例如在肢体中的长骨)后,男性和女性均发生缓慢骨丢失。在女性中,可能由于绝经后雌激素缺乏,还会发生最后阶段的重大骨丢失。在此阶段中,女性可能从皮质骨额外损失10%骨量,从小梁骨间隔额外损失25%骨量。渐进性骨丢失是否导致如骨质疏松等的病理状况,主要取决于个体的初始骨量以及是否存在加重的状况。

[0009] 骨丢失有时以正常骨重建过程失衡为特征。健康的骨骼持续不断地进行重建。重建以骨骼被破骨细胞吸收开始。然后被吸收的骨骼被新骨骼组织替代,其特征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。骨质疏松症是慢性、进行性疾病,以向吸收移动为标志,导致骨量和骨矿化的全面降低。人体的骨质疏松症之前是临床骨质减少(骨矿物质密度(骨矿密度或骨密度(bone mineral density))比年轻人骨骼的均值低大于一个标准差但小于两个标准差)。世界范围内,大约7千5百万人有骨质疏松的风险。

[0010] 因此,控制破骨细胞和成骨细胞活性之间平衡的方法对促进骨折和骨骼其他损伤的愈合,以及治疗如骨质疏松等与骨量损失和骨矿化有关的疾病可能是有用的。

[0011] 关于骨质疏松症,雌激素、降钙素、骨钙素和维生素K,或高剂量膳食钙均用作治疗性干预措施。骨质疏松的其他治疗方法包括双膦酸盐、甲状旁腺激素、拟钙剂、他汀类、合成代谢类固醇、镧和锆的盐以及氟化钠。然而这些疗法常与不希望有的不良副作用有关。

[0012] 因此,本公开的目的是提供促进骨骼生长和矿化的组合物及方法。

[0013] 发明概述

[0014] 部分地,本公开证明了具有活化素或 ActRIIa 拮抗剂活性的分子(“活化素拮抗剂”和“ActRIIa 拮抗剂”,总称为“活化素-ActRIIa 拮抗剂”)可用于增加骨密度,促进骨骼生长,和/或增加骨强度。尤其是,本公开证明了可溶形式的 ActRIIa 作为活化素-ActRIIa 信号传导的抑制剂起作用,并在体内促进骨骼密度、骨骼生长和骨骼强度增加。绝大多数促进骨骼生长或抑制骨丢失的药物用作抗分解代谢药物(通常也称为“分解代谢的药物”)(例如双膦酸盐)或者合成代谢药物(如适量给药的甲状旁腺激素,PTH),而可溶性 ActRIIa 蛋白却显示双重活性,具有抗分解代谢和合成代谢的作用。因此,本公开证实活化素-ActRIIa 信号传导途径的拮抗剂可用于增加骨密度,并促进骨骼生长。虽然可溶性 ActRIIa 可能通过除活化素拮抗作用以外的机制影响骨骼,但是本公开证明了理想的治疗药物可基于活化素-ActRIIa 拮抗剂活性进行选择。因此,在某些实施方案中,本公开提供了使用活化素-ActRIIa 拮抗剂,包括例如活化素结合 ActRIIa 多肽、抗活化素抗体、抗 ActRIIa 抗体、靶向活化素或 ActRIIa 的小分子和适体,以及降低活化素和 ActRIIa 表达的核酸,来治疗与低骨密度或低骨骼强度相关的疾病如骨质疏松,或促进有此需要的患者如骨折患者骨骼生长的方法。本公开进一步证实,活化素-ActRIIa 拮抗剂在预防和/或修复多发性骨髓瘤和乳腺肿瘤导致的骨损伤方面是有效的,此外,该活化素-ActRIIa 拮抗剂减少多发性骨髓瘤肿瘤负荷。可溶性 ActRIIa 多肽促进骨骼生长而不造成肌肉质量一致的可测量的增加。

[0015] 在某些方面,本公开提供了包含能结合于活化素的可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽的多肽。ActRIIa 多肽可制成包含活化素结合 ActRIIa 多肽和和药学上可接受的载体的药物制剂。优选地,所述活化素结合 ActRIIa 多肽结合于活化素的 K_D 小于 $1\mu M$ 或小于 100、10 或 1nM。任选地,相比于 GDF11 和/或 GDF8,所述活化素结合 ActRIIa 多肽选择性结合活化素,并且其结合活化素的 K_D 优选至少比结合 GDF11 和/或 GDF8 的低 10 倍、20 倍或 50 倍。虽然不希望受限于特定作用机制,但是预期这种程度的活化素抑制超过 GDF11/GDF8 抑制的选择性说明了对骨骼的选择性作用,而没有对肌肉有一致的可测量的作用。在许多实施方案中,为引起少于 15%、少于 10%或少于 5%的肌肉增加,会选择实现对骨骼理

想作用的剂量的 ActRIIa 多肽。优选地,如尺寸排阻色谱所测定,就其他多肽组分而言,所述组合物的纯度至少是 95%,更优选地,所述组合物的纯度至少是 98%。这样的制剂中使用的活化素结合 ActRIIa 多肽可以是本文公开的任意多肽,如具有选自 SEQ ID NOs :2、3、7 或 12 的氨基酸序列的多肽,或与选自 SEQ ID NOs :2、3、7、12 或 13 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%一致性的多肽。活化素结合 ActRIIa 多肽可以包括天然 ActRIIa 多肽的功能性片段,如包含选自 SEQ ID NOs :1-3 的序列或缺少 C 末端 10 至 15 个氨基酸(“尾部”)的 SEQ ID NO :2 的序列的至少 10、20 或 30 个氨基酸的功能性片段。

[0016] 相对于天然存在的 ActRIIa 多肽,可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽可以包括一个或多个所述氨基酸序列的改变(例如在配体结合域)。改变的 ActRIIa 多肽的例子在 WO 2006/012627,第 59-60 页中提供,在此引作参考。氨基酸序列的改变可以例如当在哺乳动物、昆虫或其他真核细胞中生成时,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解裂解。

[0017] 活化素结合 ActRIIa 多肽可以是融合蛋白,其具有作为一个结构域的 ActRIIa 多肽(例如 ActRIIa 的配体结合部分)和一个或多个另外的提供所需特性如改善的药代动力学、更易纯化、靶向特定组织等的结构域。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、组织定位或分布、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。二聚化或多聚化可提高配体结合亲和力。活化素结合 ActRIIa 融合蛋白可以包括免疫球蛋白 Fc 结构域(野生型或突变型)或血清白蛋白或其他提供所需特性,如改善的药代动力学、改善的可溶性或改善的稳定性的多肽部分。通常,将 ActRIIa-Fc 融合蛋白制备为同源二聚体复合物。任选地,ActRIIa-Fc 融合蛋白包含位于 Fc 结构域和胞外 ActRIIa 结构域之间的相对无特定结构的接头。此无特定结构的接头可以对应于 ActRIIa 胞外结构域 C 末端(所述“尾部”)的大致 15 个氨基酸无特定结构区,或者其可以是 1、2、3、4 或 5 个氨基酸,或 5 个与 15、20、30、50 个或更多氨基酸之间长度的相对无二级结构的人工序列,或两者的混合物。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/丝氨酸和甘氨酸的单序列或苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列(例如 TG₄ 或 SG₄ 单态或重复序列)。融合蛋白可以包括纯化子序列,如表位标记、FLAG 标记、多聚组氨酸序列以及 GST 融合体。任选地,可溶性 ActRIIa 多肽包括一个或多个选自以下的修饰氨基酸残基:糖基化的氨基酸、PEG 化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、缀合于脂质部分的氨基酸、缀合于有机衍生化剂的氨基酸。药物制剂也可以包括一个或多个另外的化合物,如用于治疗骨骼疾病的化合物。优选地,药物制剂基本上无热原。一般地,优选 ActRIIa 蛋白在哺乳动物细胞系中表达,所述细胞系适当地介导 ActRIIa 蛋白的天然糖基化,以消除患者的不利免疫反应的可能性。人和 CHO 细胞系已被成功使用,并且预计其他普通哺乳动物表达体系会有用。

[0018] 如本文所述,被称作 ActRIIa-Fc 的 ActRIIa 蛋白具有所需的特性,包括相对于 GDF8 和/或 GDF11 选择性结合于活化素,高亲和力配体结合以及动物模型中血清半衰期大于两周。在某些实施方案中,本发明提供 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。

[0019] 在某些方面,本公开提供了编码可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽的核酸。如上所述,分离的多核苷酸可以包含可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽的编码序列。例如,如果没有

位于跨膜结构域或胞浆结构域中的,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,分离的核酸可以包括 ActRIIa 胞外结构域(例如配体结合域)的编码序列,以及将编码部分或全部 ActRIIa 跨膜结构域和/或胞浆结构域的序列。例如分离的多核苷酸可以包含全长 ActRIIa 多核苷酸序列,例如 SEQ ID NO:4 或 5,或部分截短的形式,所述分离的多核苷酸进一步包含 3'末端之前至少 600 个核苷酸的或其他位置的转录终止密码子,这样所述多核苷酸的翻译使得胞外结构域任选地融合到全长 ActRIIa 的截短部分。优选的核酸序列是 SEQ ID NO:14。本文公开的核酸可操作地连接到用于表达的启动子,并且本文提供用这样的重组多核苷酸转化的细胞。优选地,所述细胞是哺乳动物细胞,如 CHO 细胞。

[0020] 在某些方面,本发明提供了制备可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽的方法。这样的方法可包括在合适的细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中,表达本文公开的任何核酸(如 SEQ ID NO:4、5 或 14)。这样的方法可包括:a)在适于可溶性 ActRIIa 多肽表达的条件下培养细胞,其中所述细胞用可溶性 ActRIIa 表达构建物转化;以及 b)回收这样表达的可溶性 ActRIIa 多肽。可溶性 ActRIIa 多肽可以以天然的、部分纯化的或高度纯化的组分回收。纯化可以通过一系列的纯化步骤完成,包括例如任何顺序的下述的一个、两个或三个或多个步骤:A 蛋白亲和色谱(protein A chromatography)、阴离子交换色谱(例如 Q 琼脂糖)、疏水作用层析(例如苯基琼脂糖)、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。

[0021] 在某些方面,本文公开的活化素 ActRIIa 拮抗剂,如可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽,可用于促进受试者骨骼生长或增加受试者骨密度的方法。在某些实施方案中,本公开提供治疗有此需要的患者中与低骨密度有关的疾病,或促进有此需要的患者中骨骼生长的方法。方法可包括将有效量的活化素 ActRIIa 拮抗剂施用于有此需要的受试者。在某些方面,本公开提供活化素-ActRIIa 拮抗剂在制备用于治疗本文所述疾病的药物中的用途。

[0022] 在某些方面,本公开提供鉴别刺激骨骼生长或增加骨骼矿化的药物的方法。该方法包括:a)鉴别结合到活化素或 ActRIIa 多肽的配体结合域的待测药物;以及 b)评价所述药物对骨骼生长或矿化的作用。

附图说明

[0023] 图 1 显示 CHO 细胞中所表达的 ActRIIa-hFc 的纯化。该蛋白纯化为边界清晰的单峰形式。

[0024] 图 2 显示 ActRIIa-hFc 结合至活化素和 GDF-11,通过 BiaCore™ 分析测量。

[0025] 图 3 显示了 A-204 报告基因检测的示意图。该图显示了报告载体:pGL3(CAGA)12(在 Dennler et al,1998,EMBO17:3091-3100 中有描述)。CAGA12 基序出现在 TGF- β 反应性基因(PAI-1 基因)中,因此该载体可通用于通过 Smad2 和 3 的因子信号传导。

[0026] 图 4 显示了 A-204 报告基因分析中 ActRIIa-hFc(菱形)和 ActRIIa-mFc(正方形)对 GDF-8 信号传导的作用。两种蛋白都显示出在皮摩尔浓度基本上抑制 GDF-8 介导的信号传导。

[0027] 图 5 显示了 A-204 报告基因分析中三种不同的 ActRIIa-hFc 制剂对 GDF-11 信号传导的作用。

[0028] 图 6 显示了 12 周治疗期之前(上图)和之后(底图),对照和 ActRIIa-mFc 治疗

的 BALB/c 小鼠的 DEXA 图像的示例。更浅色度显示了增加的骨密度。

[0029] 图 7 显示了 12 周期间, ActRIIa-mFc 对 BALB/c 小鼠骨矿密度作用的定量。治疗分为对照 (菱形)、2mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (正方形)、6mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (三角形) 以及 10mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (圆圈)。

[0030] 图 8 显示了 12 周期间, ActRIIa-mFc 对 BALB/c 小鼠骨矿含量作用的定量。治疗分为对照 (菱形)、2mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (正方形)、6mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (三角形) 以及 10mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (圆圈)。

[0031] 图 9 显示了经过 6 周后, ActRIIa-mFc 对切除卵巢 (OVX) 或假手术 (SHAM) C57BL6 小鼠小梁骨的骨矿密度作用的定量。治疗分为对照 (PBS) 或 10mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (ActRIIa)。

[0032] 图 10 显示了经过 12 周, ActRIIa-mFc 对切除卵巢 (OVX) C57BL6 小鼠小梁骨的作用的定量。治疗分为对照 (PBS, 浅色棒形图) 或 10mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (ActRIIa, 深色棒形图)。

[0033] 图 11 显示了 6 周或 12 周治疗期后, ActRIIa-mFc 对假手术 C57BL6 小鼠小梁骨作用的定量。治疗分为对照 (PBS, 浅色棒形图) 或 10mg/kg 剂量 ActRIIa-mFc (ActRIIa, 深色棒形图)。

[0034] 图 12 显示了经过 12 周治疗, 切除卵巢小鼠骨密度的 pQCT 分析结果。治疗分为对照 (PBS, 浅色棒形图) 或 ActRIIa-mFc (深色棒形图)。Y 轴 :mg/ccm

[0035] 图 13 描述了经过 12 周治疗, 假手术小鼠骨密度的 pQCT 分析结果。治疗分为对照 (PBS, 浅色棒形图) 或 ActRIIa-mFc (深色棒形图)。Y 轴 :mg/ccm

[0036] 图 14A 和 14B 显示了 (A) 12 周治疗之后整体 DEXA 分析和 (B) 股骨离体 (ex vivo) 分析。亮区描述了高骨密度的区域。

[0037] 图 15 显示了 12 周治疗之后, 股骨中段的离体 pQCT 分析。治疗分为溶剂对照 (PBS, 深色棒形图) 和 ActRIIa-mFc (浅色棒形图)。左侧的四个棒形图显示总骨密度, 而右侧的四个棒形图显示皮质骨密度。每组四个棒形图的第一对表示来自切除卵巢小鼠的数据, 而第二对棒形图表示来自假手术小鼠的数据。

[0038] 图 16 显示了 12 周治疗之后, 股骨中段的离体 pQCT 分析和骨干骨含量。治疗分为溶剂对照 (PBS, 深色棒形图) 或 ActRIIa-mFc (浅色棒形图)。左侧的四个棒形图显示总骨含量, 而右侧的四个棒形图显示皮质骨含量。每组四个棒形图的第一对表示来自切除卵巢小鼠的数据, 第二对棒形图表示来自假手术小鼠的数据。

[0039] 图 17 显示了股骨中段和股骨皮质厚度的离体 pQCT 分析。治疗分为溶剂对照 (PBS, 深色棒形图) 和 ActRIIa-mFc (浅色棒形图)。左侧的四个棒形图显示骨内膜周长 (endosteal circumference), 而右侧的四个棒形图显示骨外膜周长 (periosteal circumference)。每组四个棒形图的第一对表示来自切除卵巢小鼠的数据, 第二对棒形图表示来自假手术小鼠的数据。

[0040] 图 18 描述了治疗 12 周后股骨力学测试结果。治疗分为对照 (PBS, 深色棒形图) 和 ActRIIa-mFc (浅色棒形图)。左侧的两个棒形图代表来自切除卵巢小鼠的数据, 而后面两个棒形图代表来自假手术小鼠的数据。

[0041] 图 19 显示了 ActRIIa-mFc 对小梁骨体积的作用。

[0042] 图 20 显示了 ActRIIa-mFc 对股骨远端的骨小梁结构的作用。

[0043] 图 21 显示了 ActRIIa-mFc 对皮质骨的作用。

[0044] 图 22 显示了 ActRIIa-mFc 对骨骼机械强度的作用。

[0045] 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。

[0046] 图 24 显示了骨组织形态学测量,表明 ActRIIa-mFc 具有合成代谢和抗吸收的双重活性。

[0047] 图 25 显示另外的组织形态学测量数据。

[0048] 图 26 显示首次接受试验的和携带肿瘤小鼠的小鼠股骨图像,以及 ActRIIa-mFc 治疗对多发性骨髓瘤模型中骨形态的影响。携带多发性骨髓瘤 (5T2) 的小鼠相对于正常小鼠 (首次接受试验的),表现出骨骼明显的点蚀和降解。用 ActRIIa-mFc 治疗消除了这种作用。

[0049] 图 27 显示实施例 5 所述的人临床试验结果,其中无论 ActRIIa-hFc 是静脉注射 (IV) 或皮下注射 (SC) 给药,曲线下面积 (AUC) 都与 ActRIIa-hFc 的给药剂量线性相关。

[0050] 图 28 显示患者 IV 或 SC 给药后,ActRIIa-hFc 的血清水平比较。

[0051] 图 29 显示响应不同剂量水平 ActRIIa-hFc 的骨碱性磷酸酶 (BAP) 水平。BAP 是合成代谢骨骼生长的标志。

[0052] 图 30 显示 ActRIIa-mFc (RAP-011) 和双膦酸盐药物 (唑来磷酸) 对小鼠的协同效应。

[0053] 发明详述

[0054] 1. 综述

[0055] 转化生长因子 β (TGF- β) 超家族包含多种具有相同共有序列元件和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细胞类型产生生物学作用。该超家族的成员在胚胎发育过程中,在模式形成以及组织特化中执行重要功能,并能影响多种分化进程,包括脂肪生成、肌生成、软骨形成、心脏发生、造血、神经生成以及上皮细胞分化。该家族分为两大分支: BMP/GDF 和 TGF- β / 活化素 / BMP10 分支,其成员有不同的,通常是互补的作用。通过利用 TGF- β 家族成员的活性,通常可能导致生物体内重要的生理学变化。例如,皮尔蒙特 (Piedmontese) 和比利时蓝 (Belgian Blue) 牛品种带有使肌肉质量明显增加的 GDF8 (也称为肌肉生长抑制素 (myostatin)) 基因内功能丢失的突变。Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4。此外,人体中 GDF8 的非活性等位基因与肌肉质量的增加,以及据称异常强度相关。Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8。

[0056] 活化素是属于 TGF- β 超家族的二聚体多肽生长因子。有三种基本活化素形式 (A、B 和 AB), 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。人类基因组也编码主要在肝脏中表达的活化素 C 和活化素 E。在 TGF- β 超家族中,活化素是可以刺激卵巢内以及胎盘细胞中激素的产生,帮助神经细胞存活,取决于细胞类型正性或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独特和多功能的因子 (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Exp Biol Med. 198: 500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963)。此外,分离自受激人单核细胞白血病细胞的红细胞分化因子 (EDF) 被发现与活化素 A 相同 (Murata et al., 1988, PNAS, 85: 2434)。已经表明活化素 A 在骨髓中作为红细胞生成的天然、正调节因子起作用。在一些组织中,活化素信号传导被其相关的异源二聚体抑制素所拮抗。例如在

垂体释放促卵泡素 (FSH) 时,活化素促进 FSH 分泌与合成,而抑制素阻止 FSH 分泌与合成。其他的可调节活化素生物活性和 / 或与活化素结合的蛋白包括卵泡抑制素 (FS)、卵泡抑制素相关蛋白 (FSRP) 和 α_2 -巨球蛋白。

[0057] TGF- β 信号通过 I 和 II 型丝氨酸 / 苏氨酸激酶受体的异聚复合体介导,其通过配体刺激而磷酸化并激活下游 Smad 蛋白 (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 : 169-178)。这些 I 型和 II 型受体是跨膜蛋白,由带有富含半胱氨酸区的配体结合胞外结构域、跨膜结构域和带有预期丝氨酸 / 苏氨酸特异性的细胞质结构域组成。I 型受体是信号传导所必须的;II 型受体是结合配体以及表达 I 型受体所需的。I 型和 II 型活化素受体在配体结合后形成稳定的复合物,使 I 型受体被 II 型受体磷酸化。

[0058] 两种相关的 II 型受体 ActRIIa 和 ActRIIb 已被鉴定为活化素的 II 型受体 (Mathews and Vale, 1991, Cell 65 : 973-982 ; Attisano et al., 1992, Cell 68 : 97-108)。除活化素外, ActRIIa 和 ActRIIb 可以与其他几种 TGF- β 家族蛋白,包括 BMP7、Nodal、GDF8 和 GDF11 发生生化相互作用 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130 : 217-226 ; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98 : 9306-9311 ; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 17 : 949-957 ; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16 : 2749-54)。ALK4 是主要的活化素,特别是活化素 A 的 I 型受体, ALK-7 同样也可以作为活化素,特别是活化素 B 的受体。

[0059] 如本文所证明的,与其他 TGF- β 家族成员如 GDF8 或 GDF11 相反,可溶性 ActRIIa 多肽 (sActRIIa) 显示出基本上首选结合于活化素 A,能在体内有效地促进骨骼生长并增加骨密度。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采用的特定 sActRIIa 构建物所展现的非常强的活化素结合 (皮摩尔浓度的 (pM) 解离常数),预期 sActRIIa 的作用主要是由活化素拮抗剂作用引起的。不考虑机制,由本文出现的数据显而易见, ActRIIa-活化素拮抗剂确实增加正常小鼠、以及骨质疏松小鼠模型和多发性骨髓瘤小鼠模型的骨密度。应注意到,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成骨骼以及刺激矿化 (主要是成骨细胞) 的因素,以及破坏骨以及使骨骼去矿化 (主要是破骨细胞) 的因素之间的平衡。骨骼生长和矿化可以通过增加产生性因素,减少破坏性因素,或两者而增加。术语“促进骨骼生长”和“增加骨骼矿化”指的是骨骼的可见物理学变化,并且用来中性地描述骨骼中变化发生的机制。

[0060] 本文所述的研究中采用的骨质疏松和骨骼生长 / 密度的小鼠模型,被认为能高度预测人体中的效能,因而本公开提供了使用 ActRIIa 多肽以及其他活化素 ActRIIa 拮抗剂来促进人体骨骼生长并增加骨密度的方法。活化素-ActRIIa 拮抗剂包括例如活化素结合可溶性 ActRIIa 多肽,结合至活化素 (特别是活化素 A 或 B 亚单位,也称为 β A 或 β B) 并中断 ActRIIa 结合的抗体,结合至 ActRIIa 并中断活化素结合的抗体,选用于活化素或 ActRIIa 结合的非抗体蛋白 (参见例如 WO/2002/088171、WO/2006/055689 和 WO/2002/032925 中的这类蛋白的例子,以及设计和选择这种非抗体亲和力结合试剂的方法),以及选用于活化素或 ActRIIa 结合的通常缀合到 Fc 结构域的随机肽。两种具有活化素或 ActRIIa 结合活性的不同蛋白 (或其他部分),特别是分别阻断 I 型 (例如可溶性 I 型活化素受体) 或 II 型 (例如可溶性 II 型活化素受体) 结合位点的活化素结合物,可以连接在一起以产生双功能性结合分子。核酸适体、小分子和其他物质抑制活化素-ActRIIa 信号传导轴。各种蛋白具有活化素-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普遍拮抗活化素)、卵泡抑制素(如卵泡抑制素-288和卵泡抑制素-315)、FSRP、活化素C、 $\alpha(2)$ -巨球蛋白,以及M108A(在位置108由甲硫蛋白变为丙氨酸)突变体活化素A。通常活化素的替代形式,特别是I型受体结合结构域有变化的那些可以结合至II型受体,并且不能形成活性三元复合物,因而作为拮抗剂起作用。另外,抑制活化素A、B、C或E,或尤其ActRIIa表达的核酸例如反义分子、siRNAs或核酶,可以用作活化素-ActRIIa拮抗剂。优选地,所采用的活化素-ActRIIa拮抗剂会显示相对于TGF- β 家族的其他成员,尤其相对于GDF8和GDF11的抑制活化素介导的信号传导的选择性。可溶性ActRIIb蛋白确实结合至活化素,然而野生型蛋白并不显示相对于GDF8/11的结合至活化素的明显选择性,并且初步实验显示,这种蛋白对骨骼没有所需的作用,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WO 2006/012627,第55-59页,在此引作参考),并且这些蛋白可能获得对骨骼的所需效果。天然的或改变的ActRIIb可以通过偶联第二活化素选择性结合物质,而得到对活化素的更多的特异性。

[0061] 本说明书所用的术语在本领域、本发明的上下文以及每个术语使用的特定语境中,通常有其一般的意思。某些术语在下文或本说明书中其他地方讨论,用以在描述本发明的组合物和方法以及怎样制备和使用它们的方法中,向专业人员提供额外的指导。术语的任何应用范围或含义在其所使用的特定语境中是显而易见的。

[0062] “约”和“大约”通常意味着考虑到测量的性质和精度时测量量的可接受误差程度。通常,典型的误差程度在给定数值或数值范围的20%以内,优选10%以内,更优选5%以内。

[0063] 或者并且尤其地在生物学体系中,术语“大约”以及“约”可能意味着数量级范围内的值,优选给定值的5倍以内,更优选2倍以内。除非另有说明,本文给定的数量是近似的,这意味着未特意说明时,术语“大约”或“约”可以推断。

[0064] 本发明的方法可以包括比较相互间序列的步骤,包括野生型的序列与一个或多个突变体(序列变体)的比较。这样的比较通常包括多聚物序列的比对,例如使用本领域公知的序列比对程序和/或算法(例如BLAST、FASTA和MEGALIGN,仅举几例)。本领域熟练技术人员容易意识到,在突变含有残基插入或缺失的这种比对中,序列比对将在不包含所述插入或缺失残基的多聚物序列中引入“空位”(通常以破折号或“A”表示)。

[0065] “同源性”,所有其语法形式和拼写变化指的是具有“共同进化起源”的两种蛋白之间的关系,包括同种生物体的超家族蛋白,以及不同种生物体的同源蛋白。如其序列相似性所反映的,无论从一致性百分比或通过特定残基或基序和保守位点的存在,这样的蛋白(及其编码核酸)都具有序列同源性。

[0066] 术语“序列相似性”,其所有的语法形式指的是可能有或可能没有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的一致性或相对应的程度。

[0067] 然而,在常见用法和本申请中,当被如“高度”这样的副词修饰时,术语“同源的”可指序列相似性,并且可能或可能不涉及共同进化起源。

[0068] 2. ActRIIa多肽

[0069] 在某些方面,本发明涉及ActRIIa多肽。如本发明所用的术语“ActRIIa”指任何种的活化素受体IIa型(ActRIIa)蛋白家族,以及通过突变或其他修饰源自这样的ActRIIa

蛋白的变体。本文所指 ActRIIa 可以理解为指任何一种目前已鉴定的形式。ActRIIa 家族成员通常是跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸区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组成。

[0070] 术语“ActRIIa 多肽”包括包含任何天然生成的 ActRIIa 家族成员的多肽及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合体和拟肽类形式)的多肽。例如,ActRIIa 多肽包括来自与 ActRIIa 多肽序列具有至少约 80%一致性的序列的任何已知 ActRIIa 序列的多肽,优选至少 85%、90%、95%、97%、99%或更高一致性。例如,本发明的 ActRIIa 多肽可以结合至并抑制 ActRIIa 蛋白和 / 或活化素的功能。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) 以及可溶性人 ActRIIa 多肽 (例如 SEQ ID NOs :2、3、7 和 12)。

[0071] 人 ActRIIa 前体蛋白序列如下:

[0072] M G A A A K L A F A V F L I S C S S G A **ILGRSETQECLFFNANWE**
KDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV

KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNM

CNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKPP YYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPP
VLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEV KARGRGFCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENIL
QFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVS WNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIK
SKNVLLKNNLTACIADFLGALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRC
TAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGER
ITQMQLTNIITTEDIVTVVTMTNVDFPPKESSL (SEQ ID NO :1)

[0073] 信号肽加单下划线标示;胞外结构域以粗体标示,并且可能的 N- 连接糖基化位点加双下划线标示。

[0074] 人 ActRIIa 可溶的(胞外)、加工的多肽序列如下:

[0075] **ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT**
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKPP (SEQ ID NO :2)

[0076] 胞外结构域的 C- 末端“尾部”加下划线标示。“尾部”缺失(△ 15 序列)的序列如下:

[0077] **ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT**
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO :3)

[0078] 编码人 ActRIIa 前体蛋白的核酸序列如下 (Genbank 登录号 NM_001616 的核苷酸 164-1705):

[0079] ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGT
AGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACC
GTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGA
AACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTA
TATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCAC
TTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGG
GGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGAC

CCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGGGGAAGATT
TGGTTGTGTCTGGAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCAT
GGCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAA
CGAGGCACCACTGTTGATGTGGATCTTTGGCTGATCAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCCTATCAGACTTTCTTAA
GGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGG
ATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAA
AACAACCTGACAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCA
TGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTT
TGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTA
GATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCA
TAAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAG
AATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTA
ACAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCTCCCAAAGAATC
TAGTCTATGA (SEQ ID NO :4)

[0080] 编码人 ActRIIa 可溶性 (胞外) 多肽的核酸序列如下:

[0081] ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAAT
CAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
TTCCATTGAAATAGTGAAACAAGTTGTTGGCTGGATGATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAA
AAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATG
GAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID NO :5)

[0082] 在特定实施方案中,本发明涉及可溶性 ActRIIa 多肽。如本文所述,术语“可溶性 ActRIIa 多肽”通常指包含 ActRIIa 蛋白胞外结构域的多肽。本文所用的术语“可溶性 ActRIIa 多肽”包括 ActRIIa 蛋白的任何天然存在的胞外结构域及其任意变体 (包括突变体、片段和拟肽类形式)。活化素结合 ActRIIa 多肽是保留结合至活化素,特别是活化素 AA、AB 或 BB 的能力的多肽。优选地,活化素结合 ActRIIa 多肽以 1nM 或更低的解离常数结合至活化素 AA。下面提供人 ActRIIa 前体蛋白的氨基酸序列。ActRIIa 蛋白的胞外结构域结合至活化素,并且通常是可溶的,因而可称为可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽。可溶性的活化素结合 ActRIIa 多肽的例子包括 SEQ ID NOs :2、3、7、12 和 13 说明的可溶性多肽。SEQ ID NO :7 被称作 ActRIIa-hFc,并在实施例中进一步说明。其他的可溶性活化素结合 ActRIIa 多肽包括除 ActRIIa 蛋白胞外结构域之外的信号序列,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) 前导序列 (SEQ ID NO :9) 或者天然 ActRIIa 前导序列 (SEQ ID NO :10)。SEQ ID NO :13 说明的 ActRIIa-hFc 多肽使用 TPA 前导序列。

[0083] 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重组制备的多肽获得。另外,片段可以使用本领域已知的例如常规 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化学技术进行化学合成。可以制备 (重组或化学合成) 并检测所述片段,以鉴别那些能作为 ActRIIa 蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂 (抑制剂) 而起作用的肽基片段。

[0084] ActRIIa 多肽的功能活性变体可以通过筛选从编码 ActRIIa 多肽的相应诱变核酸重组生成的修饰多肽的文库获得。可以制备并检测所述变体,以鉴别能作为 ActRIIa 蛋

白或活化素介导的信号传导的拮抗剂（抑制剂）而起作用的那些。在某些实施方案中，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%一致性的氨基酸序列。在某些例子中，所述功能性变体与选自 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%一致性的氨基酸序列。

[0085] 功能性变体可以通过为诸如增强治疗功效或稳定性（例如离体保存期限以及体内抗蛋白降解）目的，修饰 ActRIIa 多肽的结构而生成。这样修饰的 ActRIIa 多肽当被选择保留活化素结合时，被认为是天然存在的 ActRIIa 多肽的功能性等同物。修饰的 ActRIIa 多肽也可以例如通过氨基酸取代、缺失或添加制备。例如，可以合理预测，以异亮氨酸或缬氨酸单独取代亮氨酸，以谷氨酸单独取代天冬氨酸，以丝氨酸单独取代苏氨酸，或者以结构相关的氨基酸类似取代氨基酸（例如保守突变）不会对产生的分子的生物学活性有大的影响。保守取代是那些在其侧链相关的氨基酸家族中发生的取代。ActRIIa 多肽氨基酸序列的变化是否产生功能同源物，可以容易地通过评估变体 ActRIIa 多肽以类似于野生型 ActRIIa 多肽的方式在细胞内产生应答的能力来确定。

[0086] 在某些实施方案中，本发明考虑了 ActRIIa 多肽的特定突变，以改变该多肽的糖基化。可选择这样的突变，以便引入或消除一个或多个糖基化位点，例如 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被适当的细胞糖基化酶特异识别的三肽序列，天冬酰胺 -X- 苏氨酸（或天冬酰胺 -X- 丝氨酸）（这里的“X”是任何氨基酸）。所述改变也可以通过向野生型 ActRIIa 多肽（对于 O- 连接的糖基化位点）添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代野生型 ActRIIa 多肽（对于 O- 连接的糖基化位点）进行。在糖基化识别位点的第一个或第三个氨基酸位点之一或两者上的各种氨基酸取代或缺失（和 / 或在第二个位点上的氨基酸缺失）导致在修饰的三肽序列的非糖基化。另一增加 ActRIIa 多肽上糖类部分数量的方法是通过化学或酶偶合糖苷至 ActRIIa 多肽。依赖于所采用的偶合方式，所述糖可连接至 (a) 精氨酸和组氨酸；(b) 游离羧基基团；(c) 游离巯基基团，如半胱氨酸的游离巯基；(d) 游离羟基，如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基；(e) 芳香残基如苯丙氨酸、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 1987 年 9 月 11 号公开的 WO 87/05330 以及 Aplin 和 Wriston(1981)CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 中有描述，在此引作参考。可通过化学和 / 或酶学的方法完成去除 ActRIIa 多肽上的一个或多个糖类部分。化学去糖基化可涉及例如 ActRIIa 多肽接触化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除了连接糖（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糖的断裂，而同时保持氨基酸序列的完整。化学去糖基化在 Hakimuddin et al. (1987)Arch. Biochem. Biophys. 259 :52and by Edge et al. (1981)Anal. Biochem. 118 :131 中有进一步的描述。ActRIIa 多肽糖部分的酶切可通过使用 Thotakura et al. (1987)Meth. Enzymol. 138 :350 所述的各种内切糖苷酶或外切糖苷酶实现。由于哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞都可以引入可被所述肽的氨基酸序列影响的不同糖基化模式，所以 ActRIIa 多肽的序列可以随使用的表达体系酌情改变。通常情况下，尽管预期其他的哺乳动物表达细胞系、具有基因工程糖基化酶的酵母细胞系和昆虫细胞也是有用的，但用于人类的 ActRIIa 多肽将在提供正确糖基化的哺乳动物细胞系如 HEK293 细胞或 CHO 细胞系中表达。

[0087] 本公开进一步考虑了生成突变体，尤其是 ActRIIa 多肽的成套组合突变体以及

截短突变体的方法;组合突变体的库对于鉴别功能性变体的序列特别有用。筛选这样组合文库的目的可能在于生成例如可作为激动剂或拮抗剂起作用,或者具有所有新活性的 ActRIIa 多肽变体。各种筛选分析在下文提供,并且这样的方法可用于评估变体。例如可筛选 ActRIIa 多肽变体是否有结合至 ActRIIa 配体,防止 ActRIIa 配体结合至 ActRII 多肽,或干扰 ActRIIa 配体引起的信号传导的能力。

[0088] ActRIIa 多肽或其变体的活性也可以在基于细胞或体内分析进行检测。例如可以评估 ActRIIa 多肽变体对涉及骨生成或骨破坏的基因表达的作用。如果需要,这可以在一个或多个重组 ActRIIa 配体蛋白(例如活化素)存在下进行,可转染细胞以生成 ActRIIa 多肽和/或其变体,以及任选的 ActRIIa 配体。同样地,ActRIIa 多肽可以施用于小鼠或其他动物,可评估一种或多种骨骼特性如密度或体积。也可评估骨折治愈率。双能量 X 射线吸收分析法(DEXA)是公认的、非损伤的评估动物骨密度的定量技术。中枢 DEXA 系统可以用于评估人的脊柱和骨盆的骨密度。这些是总骨密度最好的预测指标。外周 DEXA 系统可用于评估外周骨的骨密度,包括例如手、腕、脚踝以及足骨的骨密度。常规 X 射线成像系统包括 CAT 扫描,可用于评估骨骼生长以及骨折愈合。还可评估骨骼的机械强度。

[0089] 可生成相对于天然存在的 ActRIIa 多肽,具有选择性或通常增加的效价的组合来源的变体。同样地,突变可以导致比起相应野生型 ActRIIa 多肽,具有显著不同细胞内半衰期的变体。例如可以使改变的蛋白对蛋白水解或其他导致天然 ActRIIa 多肽被破坏或失活的细胞过程更稳定或者更不稳定。这样的变体以及编码它们的基因可通过调节 ActRIIa 多肽的半衰期,用于改变 ActRIIa 多肽水平。例如,短的半衰期可以导致更多的短暂生物学效应,并可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,可以在接头(如果有的话)和/或 Fc 部分进行突变,从而改变所述蛋白的半衰期。

[0090] 组合文库可以通过编码每个包括至少部分可能的 ActRIIa 多肽序列的多肽文库的简并基因文库制备。例如合成寡核苷酸的混合物可以酶促连接入基因序列,这样一组简并形式的可能 ActRIIa 多肽核苷酸序列可表达为单独的多肽,或表达为一组更大的融合蛋白(例如噬菌体展示的融合蛋白)。

[0091] 有很多种可从简并寡核苷酸序列生成可能同源物文库的方法。简并基因序列的化学合成可以在自动 DNA 合成仪中进行,合成的基因随后被连接到合适的载体进行表达。简并寡核苷酸的合成在本领域是公知的(参见例如 Narang, SA(1983)Tetrahedron39:3; Itakura et al., (1981)Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam:Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984)Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984)Science198:1056; Ike et al., (1983)Nucleic Acid Res. 11:477)。这样的技术已经在其他蛋白的定向进化中被采用(参见例如 Scott et al., (1990)Science249:386-390; Roberts et al., (1992)PNAS USA89:2429-2433; Devlin et al., (1990)Science249:404-406; Cwirla et al., (1990)PNAS USA87:6378-6382; 以及 U. S. 专利号:5,223,409、5,198,346 和 5,096,815)。

[0092] 或者,其他形式的突变可用于生成组合文库。例如 ActRIIa 多肽变体可以通过使用例如丙氨酸筛选突变等等的筛选(Ruf et al., (1994)Biochemistry33:1565-1572; Wang et al., (1994)J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993)Gene137:109-118; Grodberg et al., (1993)Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993)

J. Biol. Chem. 268 :2888-2892 ;Lowman et al., (1991) Biochemistry 30 :10832-10838 ;和 Cunningham et al., (1989) Science 244 :1081-1085), 通过接头扫描诱变 (Gustin et al., (1993) Virology 193 :653-660 ;Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12 :2644-2652 ;McKnight et al., (1982) Science 232 :316) ;通过饱和诱变 (Meyers et al., (1986) Science 232 :613) ;通过 PCR 诱变 (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 11 :11-19) ;或通过随机诱变, 包括化学诱变等等 (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY ;以及 Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7 :32-34), 从文库生成并分离。接头扫描诱变, 特别是在组合设定中, 是有吸引力的鉴别截短 (生物活性) 形式 ActRIIa 多肽的方法。

[0093] 在本领域中, 筛选通过点突变和截短得到的组合文库的基因产物, 以及就此而言, 筛选 cDNA 文库得到具有某种特性基因产物的大量技术是公知的。对于快速筛选通过 ActRIIa 多肽的组合突变产生的基因文库, 这样的技术一般是适用的。最广泛地用于筛选大基因文库的技术通常包括将所述基因文库克隆到可复制的表达载体中, 用获得的载体文库转化合适的细胞, 并在其中检测所需活性有利于相对容易分离编码其产物被检测的基因的载体的条件下表达组合基因。优选的检测包括活化素结合分析和活化素介导的细胞信号传导分析。

[0094] 在某些实施方案中, 除了 ActRIIa 多肽中天然存在的任何修饰, 本发明的 ActRIIa 多肽可以进一步包括翻译后修饰。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, 修饰后的 ActRIIa 多肽可含有非氨基酸元件, 如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸。这样的非氨基酸元件对 ActRIIa 多肽功能性的作用可如本文所述对其他 ActRIIa 多肽变体进行检测。当 ActRIIa 多肽通过剪切 ActRIIa 多肽的新生形式在细胞内生成时, 翻译后加工对蛋白正确折叠和 / 或功能可能也是重要的。不同细胞 (例如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293) 对于这样的翻译后活性有特定细胞机制和特有机理, 可选用以确保 ActRIIa 多肽的正确修饰和加工。

[0095] 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组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽 S 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, 以赋予所需性质。例如一些融合结构域对于通过亲和层析分离融合蛋白尤其有用。为亲和纯化的目的, 采用亲和层析相关的基质如谷胱甘肽 -、淀粉酶 - 以及镍 - 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, 如 Pharmacia 的 GST 纯化体系以及使用 (HIS₆) 融合伴侣的 QIAexpress™ 体系 (Qiagen)。作为另外的例子, 可以选择融合结构域, 以有助于 ActRIIa 多肽的检测。这样的检测结构域的例子包括各种荧光蛋白 (如 GFP) 以及“表位标记”, 其通常是可获得其特异性抗体的短肽序列。公知的容易得到其特异单克隆抗体的表位标记包括 FLAG、流感病毒血凝素 (HA) 以及 c-myc 标记。在一些实例中, 融合结构域具有诸如 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消化融合蛋白, 从而从中释放重组蛋白。然后释放的蛋白可通过随后的层析分离从融合结构域中分离。在某些优选的实施方案中, ActRIIa 多肽与体内稳定 ActRIIa 多肽的结构域 (“稳定剂”结构域) 融合。“稳定”指增加血清半衰期的任何事务, 而不考虑其是否由减少破坏、降低肾清除率或其他药物代谢

动力学作用引起。已知与免疫球蛋白 Fc 部分的融合可赋予多种多样的蛋白所需药物代谢动力学性质。同样地,与人血清白蛋白融合可赋予所需性质。可选择的其他类型的融合结构域包括多聚(例如二聚、四聚)结构域以及功能性结构域(根据需要,其赋予另外的生物学功能,例如进一步刺激骨骼生长或肌肉生长)。

[0096] 作为特定的例子,本发明提供了包含融合于 Fc 结构域的 ActRIIa 可溶性胞外结构域的融合蛋白(例如 SEQ ID NO :6)。

[0097] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV(A) VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVP I EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*

[0098] 任选地,Fc 结构域在例如 Asp-265、赖氨酸 322 和 Asn-434 的残基有一个或多个突变。在某些例子中,具有一个或多个这些突变(例如 Asp-265 突变)的突变体 Fc 结构域相对于野生型 Fc 结构域,结合至 Fc γ 受体的能力降低。在其他的例子中,具有一个或多个这些突变(例如 Asn-434 突变)的突变体 Fc 结构域相对于野生型 Fc 结构域,结合至 MHC I 类相关 Fc 受体(FcRN)的能力提高。

[0099] 可以理解,融合蛋白的不同元件可以以任何与所需功能性相一致的方式排列。例如,ActRIIa 多肽可置于异源结构域的 C 末端,或者异源结构域可置于 ActRIIa 多肽的 C 末端。ActRIIa 多肽结构域和所述异源结构域无需在融合蛋白中相邻,并且另外的结构域或氨基酸序列可以包括在两个结构域任一个的 C 末端或 N 末端或两个结构域之间。

[0100] 在某些实施方案中,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 多肽的体内半衰期,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 多肽和稳定剂结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括例如糖基化位点添加至 ActRIIa 多肽)以及糖部分的修饰(包括例如从 ActRIIa 多肽去除糖部分)。就融合蛋白而言,ActRIIa 多肽融合至如 IgG 分子的稳定剂结构域(如 Fc 结构域)。如同本文所使用的,术语“稳定剂结构域”不仅指提到的融合蛋白中的融合结构域(例如 Fc),而且包括如糖部分的非蛋白质类修饰,或如聚乙二醇的非蛋白质类聚合物。

[0101] 在某些实施方案中,本发明可获得分离和/或纯化形式的从其他蛋白分离或基本上没有其他蛋白的 ActRIIa 多肽。ActRIIa 多肽通常通过重组核酸表达而产生。

[0102] 3. 编码 ActRIIa 多肽的核酸

[0103] 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)的核酸,包括本文公开的片段、功能性变体和融合蛋白。例如 SEQ ID NO :4 编码天然存在的人 ActRIIa 前体多肽,而 SEQ ID NO :5 编码加工的 ActRIIa 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备 ActRIIa 多肽的方法,或用作直接治疗剂(例如在基因治疗方法中)。

[0104] 在某些方面,编码 ActRIIa 多肽的目标核酸进一步理解为包括是 SEQ ID NO :4 或 5 的变体的核酸。变体核苷酸序列包括不同之处在于一个或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列,如等位基因变体。

[0105] 在某些实施方案中,本发明提供了分离或重组的与 SEQ ID NO :4 或 5 具有至少

80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%一致性的核酸序列。本领域普通技术人员会理解,与 SEQ ID NO:4 或 5,以及与 SEQ ID NO:4 或 5 的变体互补的核酸序列也包括在本发明的范围内。在进一步的实施方案中,本发明的核酸可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合的,或 DNA 文库中的。

[0106] 在其他的实施方案中,本发明的核酸还包括在高严谨性条件下与 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杂交。如上所讨论的,本领域普通技术人员容易理解,促进 DNA 杂交的适宜严谨性条件可以改变。例如可以约 45℃ 下,在 6.0x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中进行杂交,随后 50℃ 下,以 2.0x SSC 洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可以选自 50℃ 下,约 2.0x SSC 的低严谨性条件至 50℃ 下,约 0.2x SSC 的高严谨性条件。另外,洗涤步骤的温度可以从约 22℃ 室温的低严谨性条件至约 65℃ 的高严谨性条件。温度和盐都可以变化,或者温度或者盐浓度可在另一个变量改变时保持恒定。在一个实施方案中,本发明提供了在室温下以 6x SSC 的低严谨性条件下杂交,随后在室温下以 2x SSC 洗涤的核酸。

[0107] 由于遗传密码子的简并性,与 SEQ ID NOs:4 或 5 中所列核酸不同的分离核酸也包括在本发明的范围内。例如大量的氨基酸被不止一个三联体指定。指定相同氨基酸的密码子或同义密码子(例如对于组氨酸,CAU 和 CAC 是同义的)可以导致不影响蛋白氨基酸序列的“沉默”突变。然而,预期导致目标蛋白氨基酸序列变化的 DNA 序列多态性会存在于哺乳动物细胞中。本领域技术人员应当了解,由于天然等位基因变异,编码特定蛋白的核酸的一个或多个核苷酸(至多约 3-5%的核苷酸)的这些变异可以存在于给定种的个体中。任意或全部这样的核苷酸变异以及得到的氨基酸多态性在本发明的范围内。

[0108] 在某些实施方案中,本发明的重组核酸可操作地连接到表达构建物的一个或多个调节核苷酸序列上。调节核苷酸序列通常适合于表达的宿主细胞。本领域公知多种宿主细胞的许多类型的合适表达载体和适宜调节序列。通常所述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、前导序列或信号序列、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。本领域已知的组成型的或诱导启动子被本发明所涵盖。启动子可以是天然存在的启动子,也可以是组合超过一个启动子元件的杂合启动子。表达构建物可存在于细胞内的游离体如质粒上,或表达构建物插入染色体。在优选实施方案中,表达载体含有选择性标记基因以供筛选转化的宿主细胞。选择性标记基因是本领域公知的,并且会随采用的宿主细胞而变化。

[0109] 在本发明的某些方面,目标核酸在包含编码 ActRIIa 多肽的核苷酸序列的表达载体中提供,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,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、增强子和其他表达控制元件。示范性的调节序列在 Goeddel ;Gene Expression Technology :Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中描述。例如,当可操作地连接到 DNA 序列时,控制 DNA 序列表达的任意各种表达调控序列可用于这些载体,以表达编码 ActRIIa 多肽的 DNA 序列。这样有用的表达调控序列包括例如 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、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、由 T7RNA 聚合酶引导表达的 T7 启动子、噬菌体 λ 的主要操作基因和启动子区、fd 衣壳蛋白的调控区、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 α -交

配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子,以及其他已知调控原核细胞或真核细胞或其病毒基因表达的序列,及其各种组合。应当理解,表达载体的设计可能取决于待转化的宿主细胞和/或想表达的蛋白类型的选择等因素。此外,还应当考虑载体的拷贝数量、控制拷贝数量和载体编码的任何其他蛋白如抗生素标记的表达的能力。

[0110] 本发明的重组核酸可以通过将克隆的基因或其部分连接到适于在原核细胞或真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)中,或在两者中表达的载体而制备。制备重组 ActRIIa 多肽的表达载体包括质粒和其他载体。例如合适的载体包括下列类型的质粒:用于在大肠杆菌等原核细胞中表达的来源于 pBR322 的质粒、来源于 pEMBL 的质粒、来源于 pEX 的质粒、来源于 pBTac 的质粒以及来源于 pUC 的质粒。

[0111] 一些哺乳动物表达载体包含有助于载体在细菌中繁殖的原核序列,以及一个或多个在真核细胞中表达的真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 和 pHyg 来源的载体是适合转染真核细胞的哺乳动物表达载体的例子。这些载体中的一部分被来自细菌质粒如 pBR322 的序列所修饰,以有助于原核细胞和真核细胞中的复制和药物抗性筛选。或者,病毒衍生物如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或 Epstein-Barr 病毒(pHEBo、pREP 源的和 p205)可用于在真核细胞中蛋白的瞬时表达。其他的病毒(包括逆转录病毒的)表达体系的例子可以在下面基因治疗传递系统(gene therapy delivery system)的描述中找到。质粒制备以及宿主生物体转化中采用的各种方法是本领域公知的。其它合适的原核和真核细胞的表达系统以及通用的重组过程参见 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在一些例子中,使用杆状病毒表达系统表达重组多肽可能是合适的。这样的杆状病毒表达系统的例子包括 pVL 来源的载体(如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941)、pAcUW 来源的载体(例如 pAcUW1)以及 pBlueBac 来源的载体(如包含 pBlueBac III 的 β -gal)。

[0112] 在优选的实施方案中,载体被设计用来在 CHO 细胞中生成目标 ActRIIa 多肽,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,例如产生蛋白包括融合蛋白或突变体蛋白,用于纯化。

[0113] 本公开还涉及用包括一个或多个目标 ActRIIa 多肽的编码序列(例如 SEQ ID NO: 4 或 5)的重组基因转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何的原核或真核细胞。例如本发明的 ActRIIa 多肽可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞(例如采用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0114] 因此本发明进一步涉及制备目标 ActRIIa 多肽的方法。例如用编码 ActRIIa 多肽的表达载体转染的宿主细胞可在适宜条件下培养,以使 ActRIIa 多肽得以表达。ActRIIa 多肽可分泌并从含有 ActRIIa 多肽的细胞和培养基的混合物中分离。或者,ActRIIa 多肽可留在细胞质中或作为膜组分保留,收集、裂解细胞并分离蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。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、宿主细胞或两者中分离,采用本领域已知的纯化蛋白的技术,包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、使用 ActRIIa 多肽特定表位的特异性抗体的免疫亲和纯化,以及

使用能结合至融合到 ActRIIa 多肽的结构域的物质亲和纯化（例如 A 蛋白柱可用于纯化 ActRIIa-Fc 融合蛋白）。在优选实施方案中，ActRIIa 多肽是包含有助于其纯化的结构域的融合蛋白。在优选实施方案中，纯化通过一系列柱层析步骤实现，包括例如以任何顺序的三个或多个的以下步骤：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液更换完成。如本文所证明的，ActRIIa-hFc 蛋白纯化至如尺寸排阻层析确定的纯度大于 98%，如 SDS PAGE 确定的纯度大于 95%。此纯度水平足以在鼠的骨骼上获得所需效果，并在小鼠、大鼠和非人灵长类中得到可接受的安全性曲线。

[0115] 在另一实施方案中，编码纯化前导序列的融合基因，如重组 ActRIIa 多肽所需部分 N 末端的多聚 (His)/ 肠激酶切割位点序列，可供使用 Ni^{2+} 金属树脂通过亲和层析纯化所表达的融合蛋白之用。纯化前导序列随后可通过肠激酶处理去除，从而提供纯化的 ActRIIa 多肽（例如参见 Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; and Janknecht et al., PNAS USA 88:8972）。

[0116] 制备融合基因的技术是本领域公知的。本质上，编码不同多肽序列的各种 DNA 片段的连接是依据常规技术，采用平端或交错末端连接、限制性酶消化以提供合适的末端、适当情况下填补粘性末端、碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接，以及酶连接进行的。在另一实施方案中，融合基因可以通过常规技术包括自动 DNA 合成仪来合成。或者，基因片段的 PCR 扩增可使用锚定引物进行，所述锚定引物导致两个连续的可随后退火产生嵌合基因序列的基因片段之间互补突出端 (complementary overhang)（参见例如 Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons:1992）。

[0117] 4. 选择性活化素和 ActRIIa 拮抗剂

[0118] 本文出现的数据证明了活化素 -ActRIIa 信号传导拮抗剂可用于促进骨骼生长以及骨矿化。尽管可溶性 ActRIIa 多肽，尤其 ActRIIa-Fc 是优选的拮抗剂，并且尽管这样的拮抗剂可通过除了活化素拮抗以外的机制影响骨骼（例如活化素抑制可能是药物抑制分子谱的活性的趋势的指示物，包括可能的 TGF- β 超家族的其他成员，并且这样的共同抑制可能引起所希望的对骨骼的作用），预期其他类型的活化素 -ActRIIa 拮抗剂是有用的，包括抗活化素（例如 A、B、C 或 E）抗体、抗 ActRIIa 抗体、反义物、抑制 ActRIIa 生成的 RNAi 或核酶核酸，以及其他的活化素或 ActRIIa 抑制剂，特别是那些扰乱活化素 -ActRIIa 结合的抑制剂。

[0119] 与 ActRIIa 多肽（例如可溶性 ActRIIa 多肽）特异性反应的抗体，以及与 ActRIIa 多肽竞争性结合至配体，或以其他方式抑制 ActRIIa 介导的信号传导的物质可用作 ActRIIa 多肽活性的拮抗剂。同样地，与活化素 A 多肽特异性反应的抗体以及干扰 ActRIIa 结合的物质可用作拮抗剂。

[0120] 使用来自 ActRIIa 多肽或活化素多肽的免疫原，可通过标准方法（参见例如 Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)）制备抗蛋白 / 抗肽抗血清或单克隆抗体。哺乳动物，如小鼠、仓鼠或兔可用 ActRIIa 多肽的免疫原形式或融合蛋白免疫，ActRIIa 多肽的免疫原形式是能够引发抗体反应的抗原片段。赋予蛋白或肽免疫原性的技术包括与载体的缀合或其他本领域公知的技术。ActRIIa 或活化素多肽的免疫原部分可在有佐剂的情况下施用。免疫过程可通过检测抗体

在血浆或血清中的滴度来监测。标准 ELISA 或其他免疫分析可与作为抗原的免疫原一起使用,以评估抗体水平。

[0121] 用 ActRIIa 多肽的抗原制剂免疫动物之后,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产生抗体的细胞(淋巴细胞),并通过标准的体细胞融合步骤与骨髓瘤细胞等无限增殖的细胞融合,以产生杂交瘤细胞。这样的技术是本领域公知的,包括例如杂交瘤技术(最初由 Kohler 和 Milstein 开发,(1975)Nature,256:495-497)、人类 B 细胞杂交瘤技术(Kozbar et al.,(1983)Immunology Today,4:72)以及生成单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术(Cole et al.,(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)。杂交瘤细胞可以通过免疫化学筛选,以产生与 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分离。

[0122] 本文所用的术语“抗体”意在包括也与目标多肽特异性反应的其片段。抗体可采用传统的技术片段化,并且如上所述以与全抗体相同方式的筛选片段用途。例如 F(ab)₂ 片段可以通过用胃蛋白酶处理产生。可以处理所得的 F(ab)₂ 片段,减少二硫桥来生成 Fab 片段。本发明的抗体进一步旨在包括由至少一个抗体 CDR 区赋予的对 ActRIIa 或活化素多肽有亲和性的双特异性的、单链的、嵌合的、人源化以及完全人源分子。抗体可进一步包括连接于其上的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)。

[0123] 在某些实施方案中,抗体是重组抗体,此术语包括了任意的部分通过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 蛋白或驼类(camelid)V_H 蛋白)。在某些实施方案中,本发明的抗体是单克隆抗体,并且在某些实施方案中,本发明提供产生新抗体的方法。例如生成能特异结合至 ActRIIa 多肽或活化素多肽的单克隆抗体的方法,可包括将一定量的包含有效刺激可检测免疫反应的抗原多肽的免疫原组合物施用于小鼠,从小鼠获得抗体生成细胞(例如脾脏细胞)并将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合得到产生抗体的杂交瘤,并检测产生抗体的杂交瘤以鉴别产生特异性结合至抗原的单克隆抗体的杂交瘤。一旦获得,即在任选的杂交瘤源的细胞生成能特异性结合至抗原的单克隆抗体的培养条件下,在细胞培养基中繁殖杂交瘤。单克隆抗体可从细胞培养物纯化。

[0124] 使用于抗体的形容词“特异性地与之反应”意在指如本领域通常理解的,抗体在感兴趣的抗原(例如 ActRIIa 多肽)和其他不感兴趣的抗原之间有足够的选择性,这样抗体能用于最低程度地检测特定类型生物样品中感兴趣的抗原的存在。在某些使用抗体的方法中,如治疗应用中,更高程度的结合特异性可能是所需的。单克隆抗体通常更趋向(与多克隆抗体相比)于有效地区分所需抗原以及交叉反应多肽。影响抗体:抗原相互作用特异性的一个特征是抗体对抗原的亲和力。尽管所需特异性可达到不同亲和力的范围,但通常优选的抗体的亲和力(解离常数)为约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更少。假如活化素和 ActRIIa 间异常紧密结合,则预期中和抗活化素或抗 ActRIIa 抗体通常有 10^{-10} 或更少的解离常数。

[0125] 另外,用于筛选抗体以鉴定所需抗体的技术可影响获得的抗体的特性。例如如果抗体要用于在溶液中结合抗原,则理想的可能是测试溶液结合。有各种测试抗体与抗原间相互作用,以鉴别尤其可取的抗体的不同技术。这样的技术包括 ELISA、表面等离子共振

结合分析（例如 Biacore™ 结合分析，Biacore AB, Uppsala, Sweden）、夹心法（例如 IGEN International, Inc. 的顺磁性磁珠体系, Gaithersburg, Maryland）、蛋白质印迹、免疫沉淀分析以及免疫组织化学。

[0126] 作为活化素或 ActRIIa 拮抗剂的核酸化合物的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。双链化合物还可以包括突出端或非互补区，这里一个或另外的链是单链。单链化合物可包括自身互补区，意味着该化合物可形成具有双螺旋结构的所谓“发夹”或“茎环”结构。核酸化合物可包括与由全长 ActRIIa 核酸序列或活化素 β A 或活化素 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 个核苷酸组成的区互补的核苷酸序列。互补区优选是至少 8 个核苷酸，任选是至少 10 个或至少 15 个核苷酸，任选地在 15 和 25 个核苷酸之间。互补区可落在内含子、靶转录物编码序列或非编码序列，如编码序列部分的范围内。通常核酸化合物会有约 8 至约 500 个核苷酸或碱基对的长度，任选地长度可以是约 14 到约 50 个核苷酸。核酸可以是 DNA（尤其作为反义核酸使用）、RNA 或 RNA:DNA 杂合体。任何一条链可包括 DNA 和 RNA 的混合物，以及不能容易地归类为或 DNA 或 RNA 的修饰的形式。同样地，双链化合物可以是 DNA:DNA、DNA:RNA 或 RNA:RNA，并且任何一条链还可以包括 DNA 和 RNA 的混合物，以及不能容易地归类为或 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（天然核酸的糖磷酸酯部分，包括核苷间连接键）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 至约 30 个核苷酸长度，并通常包含一个或多个修饰以改善稳定性等特性，所述稳定性如血清中，细胞中或化合物可能的给药位置，如胃（就口服给药化合物而言）以及肺（对于吸入的化合物）中的稳定性。就 RNAi 构建物而言，互补于靶转录物的链通常是 RNA 或其修饰形式。其他链可以是 RNA、DNA 或任何其他变异。双链或单链“发夹”RNAi 构建物的双螺旋部分优选地有 18 到 40 个核苷酸长度，任选地约 21 到 23 个核苷酸长度，只要其作为 Dicer 底物起作用。催化的或酶促核酸可以是核酶或 DNA 酶，还可含有修饰的形式。当在生理条件下以及无义或有义调控几乎没有或没有作用的浓度下与细胞接触时，核酸化合物可能抑制约 50%、75%、90% 或更多的靶表达。优选的检测核酸化合物作用的浓度为 1、5 和 10 μ M。核酸化合物可用于测试对例如骨骼生长和矿化的作用。

[0127] 5. 筛选方法

[0128] 在某些方面，本发明涉及使用 ActRIIa 多肽（例如可溶性 ActRIIa 多肽）和活化素多肽，来鉴定是活化素-ActRIIa 信号传导通路的激动剂或拮抗剂的化合物（药物）。可检测通过这种筛选鉴定的化合物，以评估它们在体外调节骨生长和骨矿化的能力。任选地，这些化合物可以进一步在动物模型中检测，以评估它们在体内调节组织生长的能力。

[0129] 有很多通过靶向活化素和 ActRIIa 多肽，筛选调节组织生长的治疗药物的方法。在某些实施方案中，可进行化合物的高通量筛选，鉴别干扰活化素或 ActRIIa 介导的对骨骼的作用的物质。在某些实施方案中，进行该分析，筛选和鉴定特异性抑制或减少 ActRIIa 多肽结合至活化素的化合物。或者，所述分析可用于鉴定增强 ActRIIa 多肽结合至活化素的化合物。在另一实施方案中，化合物可通过其与活化素或 ActRIIa 多肽相互作用的能力来鉴定。

[0130] 各种分析形式是足够的，并且根据本公开，那些本文没有明确描述的仍然可被本

领域普通技术人员领会。如本文所描述的,本发明的待测化合物(药物)可通过任何组合化学方法创造。或者,目标化合物可以是天然存在的体内或体外合成的生物分子。其作为组织生长调节剂起作用的能力待测的化合物(药物)可例如通过细菌、酵母、植物或其他生物体生成(例如天然产物),化学制备(例如小分子,包括拟肽类),或重组制备。本发明考虑的待测化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、拟肽类、糖、激素和核酸分子。在具体实施方案中,待测药物是分子量小于约 2,000 道尔顿的小的有机分子。

[0131] 本发明的待测化合物可以单个的、离散的实体形式提供,或是在更大复杂度的文库中,如组合化学制备的库中提供。这些库可以包括例如乙醇、卤代烷、胺、酰胺、酯、醛、醚以及其他类的有机化合物。出现在检测系统的待测化合物可以是分离形式或化合物的混合物形式,特别是在起始筛选步骤中。任选地,化合物可以任选用其他化合物衍生化,并具有有助于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)、光学可激活交联剂或其任意组合。

[0132] 在许多检测化合库和天然提取物的药物筛选程序中,为了使给定时期内测量的化合物数量最大化,高通量分析是可取的。在例如可用纯化的或半纯化的蛋白衍生化的无细胞系统中进行的分析通常优选作为“初步”筛选,因为它们可被构建成能允许快速开发,并相对容易地检测待测化合物介导的靶分子中的改变。此外,待测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视,由于对 ActRIIa 多肽和活化素间结合亲和力的改变可能是明显的,所述分析相反主要着重于药物对分子靶标的作用上。

[0133] 仅仅是举例说明,在本发明的示例性筛选分析中,感兴趣的化合物与分离并纯化的通常能结合至活化素的 ActRIIa 多肽相接触。然后往化合物与 ActRIIa 多肽的混合物中加入含有 ActRIIa 配体的组合物。ActRIIa/活化素复合物的检测和定量提供了确定化合物抑制(或增强)ActRIIa 多肽与活化素之间形成复合物的效力的方法。化合物的效力可通过从使用各种浓度的待测化合物获得的数据作剂量反应曲线进行评估。此外,也可进行对照分析,提供比较用的基准。例如在对照分析中,分离和纯化的活化素加到含有 ActRIIa 多肽的组合物中,在没有待测化合物的情况下定量 ActRIIa/活化素复合物的形成。应当了解,通常其中反应物的混合顺序可变化,并且可以同时混合。此外,可使用细胞提取物和溶胞产物代替纯化的蛋白,以提供合适的无细胞分析系统。

[0134] ActRIIa 多肽与活化素间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使用例如可检测标记的蛋白例如放射性标记的(如 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H)、荧光标记的(如 FITC),或酶标记的 ActRIIa 多肽或活化素,通过免疫分析或通过层析法检测来定量。

[0135] 在某些实施方案中,本发明考虑使用荧光偏振分析和荧光共振能量转移(FRET)分析,直接或间接测量 ActRIIa 多肽及其结合蛋白间相互作用的程度。进一步地,其他的检测模式,如基于光波导(PCT 公开 W0 96/26432 和美国专利 No. 5,677,196)、表面等离子共振(SPR)、表面电荷传感器以及表面力传感器的那些,与本发明的许多实施方案相容。

[0136] 此外,本发明考虑使用相互作用陷阱分析,也称为“双杂交分析”,以鉴定干扰或加强 ActRIIa 多肽与其结合蛋白间相互作用的物质。参见例如美国专利 No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; and Iwabuchi et

al. (1993) *Oncogene* 8 :1693-1696)。在特定实施方案中,本发明考虑使用反向双杂交系统,鉴定使 ActRIIa 多肽与其结合蛋白间相互作用解除的化合物(例如小分子或肽)。参见例如 Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27 :919-29 ;Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17 :374-81 ;以及美国专利 Nos. 5, 525, 490 ;5, 955, 280 ;和 5, 965, 368。

[0137] 在某些实施方案中,目标化合物通过其与本发明的 ActRIIa 或活化素多肽相互作用的能力来鉴定。化合物与 ActRIIa 或活化素多肽之间的相互作用可以是共价的或非共价的。例如这种相互作用可以使用体外生物化学方法,包括光交联、放射标记配体结合,以及亲和色谱,在蛋白水平上鉴定 (Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46 :1)。在某些例子中,化合物可在基于机制的分析,例如检测能结合至活化素或 ActRIIa 多肽的化合物的分析中筛选。这可包括固相或液相结合事件。或者,编码活化素或 ActRIIa 多肽的基因可与报道基因系统(例如 β -半乳糖苷酶、荧光素酶或绿色荧光蛋白)转染到细胞中,并优选通过高通量筛选来筛选文库,或与文库中的各成员一同转染。可使用其他基于机制的结合分析,例如检测自由能变化的结合分析。结合分析可用固定至孔、珠或芯片或被固定化抗体捕获或被毛细管电泳解离的靶标进行。被结合的化合物通常可采用比色法或荧光或表面等离子共振检测。

[0138] 在某些方面,本发明提供了调节(刺激或抑制)骨形成并增加骨质量的方法和物质。因此,任何鉴定的化合物可在全细胞或组织中、体外或体内检测,以确定其调节骨生长或骨矿化的能力。各种本领域已知的方法可用于此目的。

[0139] 例如,ActRIIa 或活化素多肽或待测化合物对骨骼或软骨生长的作用可通过在基于细胞的分析中,测量 Msx2 的诱导或骨祖细胞分化为成骨细胞来确定(参见例如 Daluiski et al., *Nat Genet.* 2001, 27(1) :84-8 ;Hino et al., *Front Biosci.* 2004, 9 :1520-9)。基于细胞的分析的另一个例子包括分析间质祖细胞以及成骨细胞中,目标 ActRIIa 或活化素多肽以及待测化合物的成骨活性。举例说明,可构建表达活化素或 ActRIIa 多肽的重组腺病毒,以感染多功能间质祖 C3H10T1/2 细胞、前成骨样 C2C12 细胞以及成骨 TE-85 细胞。然后通过测量碱性磷酸酶、骨钙蛋白以及基质矿化的诱导来确定成骨活性(参见例如 Cheng et al., *J bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8) :1544-52)。

[0140] 本发明还考虑在体内分析中测量骨骼或软骨生长。例如, Namkung-Matthai et al., *Bone*, 28 :80-86 (2001) 公开了大鼠骨质疏松模型,其中研究了骨折后早期的骨骼修复。Kubo et al., *Steroid Biochemistry&Molecular Biology*, 68 :197-202 (1999) 也公开了大鼠骨质疏松模型,其中研究了骨折后晚期的骨骼修复。Andersson et al., *J. Endocrinol.* 170 :529-537 描述了小鼠骨质疏松模型,其中小鼠是切除卵巢的,这导致小鼠丢失大量骨矿含量和骨矿密度,小梁骨丢失了大概 50% 的骨矿密度。通过施用如甲状腺旁激素的因子,可增加切除卵巢小鼠的骨密度。在某些方面,本发明使用了本领域已知的骨折愈合分析。这些分析包括骨折技术、组织学分析和生物力学分析,其在例如美国专利 No. 6, 521, 750 中有描述,其公开的导致并测量骨折程度实验方法和修复进程全部引作参考。

[0141] 6. 示范性治疗应用

[0142] 在某些实施方案中,本发明的活化素 -ActRIIa 拮抗剂(例如 ActRIIa 多肽)可用于治疗或防止与骨骼损伤相关的疾病,无论该损伤是否由例如断裂、损失或脱矿物质引

起。正如本文所说明的,活化素 -ActRIIa 拮抗剂,尤其是 ActRIIa-Fc 构建物在治疗或预防癌症相关的骨丢失上是有效的。在某些实施方案中,本发明提供了通过给个体施用治疗有效剂量的活化素 -ActRIIa 拮抗剂,尤其是 ActRIIa 多肽,治疗或预防有此需要的个体的骨骼损伤的方法。在某些实施方案中,本发明提供了通过给个体施用治疗有效剂量的活化素 -ActRIIa 拮抗剂,尤其是 ActRIIa 多肽,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,更优选地着眼于人的治疗以及预防性治疗。在某些实施方案中,本公开提供活化素 -ActRIIa 拮抗剂(尤其是可溶性 ActRIIa 多肽以及靶向活化素或 ActRIIa 的中和抗体)在治疗与低骨密度或降低的骨强度相关的疾病中的用途。

[0143] 如本文所使用的“预防”疾病的疗法指在统计学样本中,相对于未治疗对照样本,减少治疗样本中疾病发生的化合物,或者相对于未治疗对照样本,延迟疾病发病或降低疾病的一个或多个症状的严重程度的化合物。本文所用的术语“治疗”包括预防指定疾病,或一旦已经有病,则改善或消除所述疾病。在任一种情况下,预防或治疗可在医师提供的诊断,以及施用治疗药物的预期结果中辨别。

[0144] 本公开提供了诱导骨骼和/或软骨形成、预防骨丢失、增加骨矿化或预防骨骼脱矿物质的方法。例如,目标活化素 -ActRIIa 拮抗剂应用于治疗人或其他动物的骨质疏松,治愈人或动物的骨折和软骨缺损。ActRIIa 或活化素多肽对诊断为亚临床低骨密度的患者是有效的,作为对抗骨质疏松发展的保护性措施。

[0145] 在一个具体实施方案中,本发明的方法和组合物在人和其他动物的骨折愈合以及软骨缺损中可能有医疗效用。目标方法和组合物在闭合的和开放的骨折复位,还在人工关节的改良固定中可能还具有预防性用途。成骨物质诱导的从新骨形成有助于先天的、外伤引起的或肿瘤切除引起的颅面缺损的修复,在整形美容术中也是有用的。在某些例子中,目标活化素 -ActRIIa 拮抗剂可提供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细胞的祖细胞的分化。本发明的活化素 -ActRIIa 拮抗剂在骨质疏松的治疗中也是有用的。

[0146] 本发明的方法和组合物可应用于以骨丢失为特征或导致骨丢失的疾病,如骨质疏松(包括继发性骨质疏松)、甲状旁腺功能亢进、Cushing 病、Paget 病、甲状腺功能亢进、慢性腹泻状态或吸收不良、肾小管酸中毒或神经性厌食。

[0147] 骨质疏松可由各种原因引起或与之相关。女性特别是绝经后的女性,体重低,以及久坐的生活方式都是骨质疏松(丢失骨矿密度,导致骨折风险)的风险因素。具有任何下列概况的人可能是用 ActRIIa 拮抗剂治疗的人选:绝经后女性,且没有服用雌激素或接受其他激素替代疗法;有个人或母系股骨骨折或吸烟史的人;高(超过 5 英尺 7 英寸)或瘦(少于 125 磅)的绝经后女性;有骨丢失相关临床状况的男性;使用已知导致骨丢失的药物的人,这些药物包括皮质类固醇如强的松[™]、各种抗癫痫发作药物如苯妥英钠[™]和某些巴比妥酸盐,或高剂量甲状腺替代药物;有 I 型糖尿病、肝病、肾病或骨质疏松家族史的人;有高骨转换(例如尿样中胶原过多)的人;有甲状腺疾病如甲状腺功能亢进的人;已经经历过仅轻度外伤后骨折的人;有脊椎骨折的 X 射线证据或骨质疏松其他迹象的人。

[0148] 如上所提到的,骨质疏松也可以是与另一种疾病相关的或使用某些药物导致的疾病。药物或其他医学状况导致的骨质疏松被称为继发性骨质疏松。在已知为 Cushing 病的

疾病中,身体产生的过多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皮质类固醇,它是一类像皮质醇一样起作用的药物,是由肾上腺天然产生的激素。尽管适当水平的甲状腺激素(其由甲状腺产生)是骨骼发育需要的,但过量的甲状腺激素可随时间推移降低骨量。当有肾脏问题的人,特别是正在透析的人摄入高剂量含有铝的抗酸剂时,可导致骨丢失。其他的可导致继发性骨质疏松的药物包括用于预防癫痫发作的苯妥英(苯妥英钠)和巴比妥酸盐;甲氨蝶呤(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS),用于一些种类的关节炎、癌症或免疫疾病的药物;环孢霉素(Sandimmune, Neoral),用于治疗一些自身免疫性疾病以及抑制器官移植患者免疫系统的药物;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;肝素(Calciparine, Liqueamin),抗凝血药物;以及消胆胺和考来替泊,用于治疗高胆固醇。癌症治疗导致的骨丢失被广泛地认知,并被称为癌症治疗诱导的骨质丢失(CTIBL)。骨转移可在骨骼上造成通过活化素-ActRIIa拮抗剂治疗可纠正的洞。

[0149] 在优选实施方案中,本文公开的活化素-ActRIIa拮抗剂,尤其是可溶性ActRIIa可用于癌症患者。由于肿瘤诱导的骨丢失以及骨转移和治疗剂的原因,有某些肿瘤(例如前列腺、乳腺、多发性骨髓瘤或任何引起甲状腺功能亢进的肿瘤)的患者有骨丢失的高风险。甚至在缺乏骨丢失或骨转移的证据的情况下,这样的患者可以用活化素-ActRIIa拮抗剂治疗。还可以监测患者的骨丢失或骨转移的证据,如果指示物显示风险上升时,可以用活化素-ActRIIa拮抗剂治疗。通常,采用DEXA扫描评估骨密度的改变,而骨重建的指示物可用于评估骨转移的可能性。可监测血清标记物。骨骼特异性碱性磷酸酶(BSAP)是存在于成骨细胞中的酶。BSAP的血液水平在有骨转移以及其他导致骨重建增加的疾病的患者中是上升的。骨钙素以及原骨胶原肽也与骨骼形成和骨转移相关。在有前列腺癌导致的骨转移的患者中,已经检测到BSAP的上升,并且在乳腺癌导致的骨转移中检测到较小程度的上升。骨形态发生蛋白-7(BMP-7)在已骨转移至骨骼的前列腺癌中是高的,但在膀胱、皮肤、肝或肺癌引起的骨转移中不高。I型羧基末端端肽(ICTP)是骨吸收期间形成的胶原中发现的交联物。由于经常骨折并重建,会在全身发现ICTP。然而,在骨转移的位置,ICTP水平将显著高于正常骨骼的区域。在前列腺、肺及乳腺癌引起的骨转移中,已经发现高水平的ICTP。另一种胶原交联物I型N末端端肽(NTx),在骨转换过程中与ICTP一同产生。在很多种不同类型的癌症包括肺、前列腺以及乳腺癌引起的骨转移中,NTx的量是增加的。NTx水平的增加还伴随着骨转移的发展。因此,此标记物可用于检测骨转移并衡量疾病的程度。其他的吸收标记物包括吡啶啉和脱氧吡啶啉。吸收标记物以及骨转移标记物的任何增加表明患者需要活化素-ActRIIa拮抗剂治疗。

[0150] 活化素-ActRIIa拮抗剂可与其他药物协同给药。协同给药可通过单一复合制剂(co-formulation)给药,同时或分时段给药来实现。如果与其他骨骼活性药物一起给药,活化素-ActRIIa拮抗剂可能会尤其有利。患者可从接受活化素-ActRIIa拮抗剂,同时服用钙补强剂、维生素D、进行适当锻炼和/或在某些情况下服用其他药物中受益。其他药物的例子包括双膦酸盐(阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐和利塞膦酸盐)、降钙素、雌激素、甲状旁腺素以及雷洛昔芬。双膦酸盐(阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐和利塞膦酸盐)、降钙素、雌激素和雷洛昔芬影响骨骼重建周期,被归类为抗吸收药物。骨骼重建由两个不同的阶段组成:骨吸收和骨形成。抗吸收药物减缓或停止骨重建周期的骨吸收部分,但不减缓周期的骨形成部

分。结果是,新的形成速率持续大于骨吸收速率,骨骼密度可随时间推移而增加。特立帕肽(Teriparatide)是甲状旁腺素的一种形式,增加骨重建周期中的骨形成速率。阿仑膦酸盐已批准用于绝经后骨质疏松的预防(每天5毫克或每周一次35毫克)和治疗(每天10毫克或每周一次70毫克)。阿仑膦酸盐减少骨丢失,增加骨密度并降低脊柱、腕和髌的骨折风险。阿仑膦酸盐也批准用于治疗长期应用这些药物(即强的松和可的松)导致的男性和女性的糖皮质激素诱导的骨质疏松,并用于男性骨质疏松的治疗。阿仑膦酸盐加维生素D被批准用于治疗女性绝经后骨质疏松(每周一次70毫克,加维生素),并用于治疗提高患有骨质疏松的男性的骨量。伊班膦酸盐被批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松。作为每月服用一次的药丸(150mg),伊班膦酸盐必须在每月的同一天服用。伊班膦酸盐减少骨丢失,增加骨密度并降低脊柱骨折的风险。利塞膦酸盐被批准用于预防和治疗绝经后的骨质疏松。每天服用(5mg剂量)或每周服用(35mg剂量或35mg剂量加上钙),利塞膦酸盐减缓骨丢失,增加骨密度并降低脊柱骨折和非脊柱骨折的风险。利塞膦酸盐还被批准用于男性和女性,以预防和/或治疗长期使用这些药物(即强的松和可的松)所致的糖皮质激素诱导的骨质疏松。降钙素是天然存在涉及钙调节和骨骼新陈代谢的激素。在绝经期5年以上的女性中,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。降钙素降低脊柱骨折的风险。降钙素可作为注射剂(每天50-100IU)或鼻喷雾剂(每天200IU)使用。雌激素治疗(ET)/激素治疗(HT)被批准用于预防骨质疏松。ET已经证实减少骨丢失,增加脊柱和髌的骨密度,并降低绝经后女性的髌和脊柱骨折的风险。ET给药最常见的是以每日给药约0.3mg的低剂量或每日约0.625mg标准剂量的丸剂或皮肤贴剂的形式,甚至70岁后开始也有效。当单独摄入雌激素时,可增加女性子宫内膜癌症(子宫内膜癌)发展的风险。为消除此风险,提供医疗服务的机构为那些有完整子宫的女性开的处方是孕酮激素与雌激素联合使用(激素替代治疗或HT)。ET/HT减轻绝经期症状,并且已经证实对骨骼健康有益效果。副作用包括阴道流血、乳房触痛、情绪扰动以及胆囊疾病。雷洛昔芬每天60mg被批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松。它源于一类叫做选择性雌激素受体调节剂(SERMs)的药物,该药物已被开发用来提供雌激素的有益效果而没有其可能不利之处。雷洛昔芬增加骨量并降低脊柱骨折的风险。仍未获得数据证明雷洛昔芬能降低髌和非其它脊柱骨折的风险。特立帕肽是一种甲状旁腺激素,已被批准用于有骨折高风险的绝经后女性和男性骨质疏松症的治疗。此药物刺激新骨骼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。特立帕肽是自身给药的,每日注射持续最高达24个月。

[0151] 7. 药物组合物

[0152] 在某些实施方案中,本发明的活化素-ActRIIa拮抗剂(例如ActRIIa多肽)与药学上可接受的载体一起配制。例如,ActRIIa多肽可单独或作为药物制剂(治疗组合物)的成分给药。目标化合物可以配制以任何便利的方式用于人或兽药的给药形式。

[0153] 在某些实施方案中,本发明的治疗方法包括全身性施用组合物或以植入体或装置局部给药。给药时,用于本发明的治疗组合物是无热原的、生理上可接受的形式。在本发明的方法中,除了如上所述也可以任选地包括在上述组合物中的ActRIIa拮抗剂外,治疗有效的药物可与目标化合物(例如ActRIIa多肽)同时或相继给药。

[0154] 通常 ActRIIa 拮抗剂会在胃肠外给药,尤其是静脉注射或皮下给药。适合胃肠外给药的药物组合物可包括一种或多种 ActRIIa 多肽以及与之组合的一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散剂、混悬剂或乳剂,或临用前可复溶成无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉末,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与目标受者的血液等渗的溶质或助悬剂或增稠剂。可被本发明的药物组合物采用的合适的水和非水载体的例子包括水、乙醇、多羟基化合物(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)及其合适的混合物,植物油如橄榄油,以及可注射有机酯如油酸乙酯。例如可通过使用包衣材料如卵磷脂,通过保持分散剂的所需颗粒大小,并通过使用表面活性剂,可保持适当的流动性。

[0155] 此外,组合物可被装入胶囊或以向靶组织部位(例如骨骼)给药的形式注射。在某些实施方案中,本发明的组合物可包括能将一种或多种治疗化合物(例如 ActRIIa 多肽)给药至靶组织部位(如骨骼)的基质,为发育的组织提供结构,并且最理想地能被身体吸收。例如该基质可提供缓慢释放的 ActRIIa 多肽。这样的基质可由现在用于其它植入药物应用的物质形成。

[0156] 基质物质的选择是基于生物适应性、生物降解性、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制剂。组合物的可能基质是生物可降解的以及化学上明确的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷石灰、聚乳酸以及聚酸酐。其它可能的物质是生物可降解的并且生物学上非常明确的,如骨骼或真皮胶原。其它的基质由纯蛋白或细胞外基质成分组成。其它可能的基质是非生物可降解的并且生物学上非常明确的,如烧结的羟基磷石灰、生物玻璃、铝酸盐或其他陶瓷。基质可由任何上面提及类型的物质,如聚乳酸和羟基磷石灰或胶原和磷酸三钙的组合组成。可改变生物陶瓷的组成,如钙-铝酸盐-磷酸盐(calcium-aluminate-phosphate)以及加工以改变孔径、颗粒大小、颗粒形状以及生物降解性。

[0157] 在某些实施方案中,本发明的方法可以口服给药,例如以胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(采用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯树胶或西黄蓍胶)、粉末剂、颗粒剂,或在含水或非水液体中的溶液剂或混悬剂,或水包油或油包水的液体乳剂,或酏剂或糖浆剂,或软锭剂(采用惰性基质,如凝胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)和/或漱口剂等的形式,每种都包含预定量的作为活性成分的药物。药物也可以以大丸剂、干药糖剂或糊剂给药。

[0158] 在口服给药的固态剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末剂、颗粒剂等等)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,如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或任何下面的物质混合:(1)填充剂或膨胀剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,如羧甲基纤维素、藻酸盐、凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3)湿润剂如甘油;(4)崩解剂,如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠;(5)溶液缓释剂,如石蜡;(6)吸收促进剂,如季铵化合物;(7)润湿剂,如十六醇和甘油单硬脂酸酯;(8)吸收剂,如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁和固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;以及(10)着色剂。在胶囊剂、片剂以及丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。使用如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等等这样的辅料,相似类型的固态组合物也可用作软的或硬的填充明胶胶囊的填充剂。

[0159] 口服给药的液态剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂

和酞剂。除活性成分外,液态剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂,如水或其他溶剂,增溶剂和乳化剂,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、1,3-丁二醇、油(尤其是棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻以及芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、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,口服组合物还可包括如润湿剂、乳化和混悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、香味剂以及防腐剂的辅剂。

[0160] 除了活性化合物外,混悬剂可含有如乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏铝酸(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂-琼脂和西黄蓍胶及其混合物的助悬剂。

[0161] 本发明的组合物还可含有辅剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗菌和抗真菌药,如尼泊金类、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保防止微生物的活动。组合物中包括等渗剂,如糖、氯化钠等,这可能也是可取的。此外,注射药物形式的延长吸收可通过包含延迟吸收的物质,如单硬脂酸铝和凝胶产生。

[0162] 可以理解,给药方案会由主治医师考虑各种改变本发明的目标化合物(例如 ActRIIa 多肽)作用的因素后确定。所述各种因素包括但不限于需要形成的骨骼重量的量、骨密度丢失的程度、骨损伤的位置、受损骨骼的状况、患者年龄、性别和饮食、可能促进骨丢失的任何疾病的严重程度、给药时间以及其他临床因素。任选地,剂量可随重建中使用的基质类型以及组合物中化合物类型而变化。加到最终组合物中的其他已知生长因子也可影响剂量。进程可通过定期评估骨骼生长和/或修复,例如 X 射线(包括 DEXA)、组织形态学测定和四环素标记来监测。

[0163] 灵长类动物和人类实验已经表明,当化合物间隔给药且剂量足以达到约 200ng/ml 的血清浓度时,ActRIIa-Fc 对骨骼的作用是可检测的,在剂量为 0.3mg/kg 时出现对合成代谢骨骼生物标记的半数最大效应或相当的曲线下面积。在人类中,200ng/ml 的血清水平可通过 0.1mg/kg 或更高的单剂量达到,1000ng/ml 的血清药物水平可通过 0.3mg/kg 或更高的单剂量达到。观察到的分子的血清半衰期在约 25 天到 35 天之间,显著长于大多数 Fc 融合蛋白,因此持久有效的血清水平可例如通过根据每周或双周给药约 0.05-0.5mg/kg,或采用更高的剂量和给药之间更长的时间间隔实现。例如,每月或双月可使用例如 0.1、0.3、0.5、0.7、1、2 或 3mg/kg 的剂量或之间的值,对骨骼的效果足够持久,这样每 3、4、5、6、9、12 或更多个月仅需给药一次。给药之间更长的时间间隔进一步由药效持续时间支持,该药效持续时间比血清中药物持续时间长。观察人患者至少 120 天的 PD 作用。

[0164] 在某些实施方案中,本发明还提供了体内产生 ActRIIa 多肽的基因治疗。这样的治疗会通过将 ActRIIa 多核苷酸序列引入患有如上所列疾病的细胞或组织中,实现其治疗效果。ActRIIa 多核苷酸序列的递送可使用重组表达载体如嵌合病毒或胶体分散体系实现。ActRIIa 多核苷酸序列的治疗递送优选使用靶向脂质体。

[0165] 本文所教导的各种可用于基因治疗的病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘,或优选 RNA 病毒如逆转录病毒。优选地,逆转录病毒载体是鼠类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:莫洛尼鼠类白血病病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠类乳腺肿瘤病毒(MuMTV)以及劳氏肉瘤病毒(RSV)。大量其他的逆转录病毒载体可包含多个基因。所有这些载体可转移或包含选择性标记的基因,从而可鉴别并生成转导细胞。逆转录病毒载体可通过连接例如糖、糖脂或蛋白质而制成靶特

异性的。使用抗体实现优选的靶向。本领域技术人员会意识到特异性多核苷酸序列可插入到逆转录病毒基因组中或连接到病毒包膜,以使含有 ActRIIa 多核苷酸的逆转录病毒载体得以靶特异性递送。在优选实施方案中,载体靶向作用于骨骼或软骨。

[0166] 或者,组织培养细胞可通过常规磷酸钙转染,用编码逆转录病毒结构基因 gag、pol 和 env 的质粒直接转染。然后这些细胞用含有感兴趣的基因的载体质粒转染。得到的细胞将逆转录病毒载体释放到培养基中。

[0167] 另一 ActRIIa 多核苷酸的靶向递送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、珠子以及基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束以及脂质体。本发明优选的胶体系统是脂质体。脂质体是用作体外和体内递送载体的人工膜囊。RNA、DNA 以及完整的病毒粒子可包封在含水的内部中,并以生物活性形式递送到细胞(见例如 Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。采用脂质体载体高效转运基因的方法是本领域已知的,参见例如 Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988。脂质体组合物通常是磷脂的组合,通常与甾族化合物特别是胆固醇组合。也可使用其他的磷脂或其他的脂质。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。

[0168] 用于生产脂质体的脂质的例子包括磷脂酰化合物,如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、脑苷脂和神经节苷脂。示例性的磷脂包括蛋黄磷脂酰胆碱、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,并且为本领域所知。

实施例

[0169] 本发明现在是一般性描述,通过参照下述实施例会更容易理解,包括的实施例仅为解释某些实施方案以及本发明实施方案的目的,并不打算用于限制本发明。

[0170] 实施例 1: ActRIIa-Fc 融合蛋白

[0171] 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,两结构域之间用最小的接头连接。构建物分别称为 ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc。

[0172] 从 CHO 细胞系统纯化的 ActRIIa-hFc 如下显示 (SEQ ID NO:7):

[0173] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0174] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 蛋白在 CHO 细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列:

[0175] (i) 蜜蜂蜂毒溶血肽 (mellitin) (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO:8)

[0176] (ii) 组织型纤溶酶原激活剂 (TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO:9)

[0177] (iii) 天然的: MGAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO:10).

[0178] 选择的形式采用 TPA 前导序列并具有以下未加工的氨基酸序列:

[0179] MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGAA ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATW

KNISGSIEIVKQGCWLDIDNCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO :13)

[0180] 该多肽由下面的核苷酸序列编码：

[0181] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCCGC
GCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGCTTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAA
ACTGGTGTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTC
CATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGA
CAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTATTTTCCGGAGATGGAAG
TCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO :14)

[0182] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 都格外易于重组表达。如图 1 所示,蛋白纯化为边界清晰的单峰蛋白。N 末端测序显示了 -ILGRSTQE (SEQ ID NO :11) 的单个序列。纯化可通过一系列的柱层析步骤完成,包括例如任何顺序的三个或多个以下步骤: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。纯化可通过病毒过滤以及缓冲液更换完成。ActRIIa-hFc 蛋白纯化至如尺寸排阻层析确定的纯度大于 98%,如 SDS PAGE 确定的纯度大于 95%。

[0183] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 显示了对配体,尤其是对活化素 A 的高亲和性。GDF-11 或活化素 A (“ActA”) 周标准胺偶联步骤固定在 Biacore CM5 芯片上。ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 蛋白加样至系统,并测量结合。ActRIIa-hFc 结合至活化素的解离常数 (K_D) 为 5×10^{-12} ,蛋白结合至 GDF11 的 K_D 为 9.96×10^{-9} 。见图 2。ActRIIa-mFc 表现类似。

[0184] A-204 报告基因分析用于评价 ActRIIa-hFc 蛋白对 GDF-11 和活化素 A 介导的信号传导的影响。细胞系:人横纹肌肉瘤(来自肌肉)。报告载体:pGL3(CAGA)12(在 Dennler et al,1998,EMBO17:3091-3100 中描述)。参见图 3。CAGA12 基序存在于 TGF- β 应答基因(PAI-1 基因)中,因此这个载体可通用于通过 Smad2 和 3 的因子信号传导。

[0185] 第一天:把 A-204 细胞分到 48 孔板中。

[0186] 第二天:A-204 细胞用 $10 \mu\text{g}$ pGL3(CAGA)12 或 pGL3(CAGA)12($10 \mu\text{g}$)+pRLCMV($1 \mu\text{g}$) 和 Fugene 转染。

[0187] 第三天:加入因子(用培养基+0.1% BSA 稀释)。加入到细胞之前,需要将抑制剂

与因子预孵育 1 小时。6 小时后,细胞用 PBS 洗涤,裂解细胞。

[0188] 此后是荧光素酶分析。通常在该分析中,在没有任何抑制剂存在下,活化素 A 对报告基因表达显示约 10 倍的刺激作用,ED50 ~ 2ng/m。GDF-11 : 16 倍刺激,ED50 : ~ 1.5ng/ml。GDF-8 显示类似于 GDF-11 的效果。

[0189] 如图 4 中所示,皮摩尔浓度的 ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 抑制 GDF-8 介导的信号传导。如图 5 所示,三种不同的 ActRIIa-hFc 制剂抑制 GDF-11 信号传导,IC50 大约 200pM。

[0190] 在药代动力学研究中 ActRIIa-hFc 非常稳定。大鼠给予 1mg/kg、3mg/kg 或 10mg/kg 剂量的 ActRIIa-hFc 蛋白,在 24、48、72、144 和 168 小时测量该蛋白的血浆水平。在单独的研究中,大鼠给予 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg 的剂量。大鼠中,ActRIIa-hFc 的血清半衰期为 11-14 天,两周后药物的循环水平相当高(起始剂量 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg 分别对应 11 μ g/ml、110 μ g/ml 或 304 μ g/ml)。食蟹猴中,血浆半衰期显著大于 14 天,药物的循环水平为 25 μ g/ml、304 μ g/ml 或 1440 μ g/ml,分别对应起始浓度 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg。人类中的初步结果显示,血清半衰期在约 20 至 30 天之间。

[0191] 实施例 2 :ActRIIa-mFc 在体内促进骨骼生长

[0192] 正常雌性小鼠 (BALB/c) 给予 1mg/kg/ 次、3mg/kg/ 次或 10mg/kg/ 次水平的 ActRIIa-mFc,每周给药 2 次。骨矿密度和骨矿含量通过 DEXA 确定,见图 6。

[0193] 在 BALB/c 雌性小鼠中,DEXA 扫描显示 ActRIIa-mFc 治疗使骨矿密度和含量显著增加 (> 20%)。见图 7 和 8。

[0194] 因此,ActRIIa 的拮抗引起正常雌性小鼠骨密度和含量增加。下一步检测了 ActRIIa-mFc 对骨质疏松症小鼠模型中骨骼的作用。

[0195] Andersson et al. (2001) 证实,切除卵巢的小鼠遭受重大的骨丢失(术后 6 周大概丢失了 50% 的小梁骨),并且这些小鼠中的骨丢失可用候选治疗药物如甲状旁腺激素纠正。

[0196] 申请人采用 4-5 周龄时切除卵巢 (OVX) 或假手术的 C57BL6 雌性小鼠。术后 8 周,开始用 ActRIIa-mFc (10mg/kg,每周两次) 或对照 (PBS) 治疗。用 CT 扫描仪测量骨密度。

[0197] 如图 9 所示,6 周后相对于假手术对照,未治疗的切除卵巢的小鼠显示可观的小梁骨骨密度丢失。ActRIIa-mFc 治疗将骨密度恢复到假手术小鼠的水平。在治疗 6 周和 12 周时,ActRIIa-mFc 引起 OVX 小鼠小梁骨的可观增长。见图 10。6 周治疗后,相对于 PBS 对照,骨密度增加了 24%。12 周后,增加了 27%。

[0198] 在假手术小鼠中,ActRIIa-mFc 也引起了小梁骨的可观的增加。见图 11。6 周和 12 周后,相对于对照,治疗产生了 35% 的增加。

[0199] 在另外一组实验中,如上所述的切除卵巢 (OVX) 或假手术小鼠用 ActRIIa-mFc (10mg/kg,每周两次) 或对照 (PBS) 处理 12 周以上。类似于上述 ActRIIa-mFc 的结果,接受 ActRIIa-mFc 的 OVX 小鼠早在治疗 4 周时即显示小梁骨密度增加了 15%,治疗 12 周后增加了 25% (图 12)。接受 ActRIIa-mFc 的假手术小鼠类似地早在治疗 4 周时即显示小梁骨密度增加了 22%,治疗 12 周后增加了 32% (图 13)。

[0200] 用 ActRIIa-mFc 治疗 12 周后,全身以及离体股骨 DEXA 分析显示,治疗引起切除卵巢的和假手术小鼠的骨密度增加(分别为图 14A 和图 14B)。这些结果也被股骨中段的离体 pQCT 分析所支持,证明了用 ActRIIa-mFc 治疗 12 周后,总的和皮质骨密度均显著增加。溶剂

处理的对照切除卵巢小鼠显示骨密度与溶剂处理的对照假手术小鼠相当（图 15）。除骨密度外，ActRIIa-mFc 治疗后骨含量增加。股骨中段的离体 pQCT54 分析证明，用 ActRIIa-mFc 治疗 12 周后，总的以及皮质骨的骨含量均显著增加，而切除卵巢的和假手术溶剂对照处理的小鼠显示相当的骨含量（图 16）。股骨中段的离体 pQCT 分析还显示，ActRIIa-mFc 治疗的小鼠没有显示骨外膜周长的变化，而 ActRIIa-mFc 治疗导致骨内膜周长减小，这表明皮质厚度的增加是由股骨内表面的生长引起的（图 17）。

[0201] 股骨的力学测试确定了，ActRIIa-mFc 能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。用 ActRIIa-mFc 治疗的去卵巢小鼠显示骨强度增加到超过假手术的、溶剂处理对照的小鼠的水平，这表明骨质疏松表现型的完全逆转（图 18）。

[0202] 这些数据证明，活化素 -ActRIIa 拮抗剂可增加正常雌性小鼠的骨密度，此外在骨质疏松小鼠模型中纠正骨密度、骨含量以及最终骨骼强度的缺陷。

[0203] 在另一组实验中，小鼠在 4 周时切除卵巢或假手术，在 12 周开始接受安慰剂或 ActRIIa-mFc（每周两次，10mg/kg）（在图 19-24 中也被称作 RAP-11），再进行 12 周。评价各种骨骼参数。如图 19 所示，ActRIIa-mFc 增加 OVX 和 SHAM 手术小鼠的脊椎小梁骨体积与总体积之比（BV/TV）。ActRIIa-mFc 还改善小梁骨结构（图 20），增加皮质厚度（图 21）并改善骨骼强度（图 22）。如图 23 所示，1mg/kg 至 10mg/kg 剂量范围的 ActRIIa-mFc 产生理想的效果。

[0204] 骨组织形态测量在假手术小鼠的 2 周时间点进行。图 24 中的这些数据证明 ActRIIa-mFc 具有双重作用，既抑制骨骼吸收又促进骨骼生长。因此 ActRIIa-mFc 刺激骨骼生长（合成代谢作用）并抑制骨骼吸收（抗分解代谢作用）。BV = 骨体积；TV = 总组织体积。BV/TV 是矿化的骨体积百分比的量度标准。ES = 侵蚀表面；BS = 骨表面。ES/BS 是骨侵蚀的量度标准，RAP-011 所造成降低表明抗吸收或抗分解代谢作用。Ms/Bs 是矿化表面 / 骨表面比，是骨骼生长或合成代谢作用的指示物。类似地，骨矿质接合速率（MAR）和每天每个骨表面的骨形成速率（BFR/BSd）表明骨骼生长。测量成骨细胞（Nob/BPm）和破骨细胞（Noc/BPm），探索作用的机理。

[0205] 第二次骨骼组织形态学测量实验在雌性 C57BL/6 小鼠中进行，12 周龄时开始。小鼠腹腔内给药 10mg/kg ActRIIa-mFc，每周两次，给药两周、四周、八周或十二周。每组最后给药之后五天处死，取骨骼进行分析。安乐死前，小鼠用钙黄绿素标记 9 天和 2 天。如图 25 所示，计量学表明 ActRIIa-mFc 促进骨骼生长和矿化，并具有合成代谢和抗分解代谢作用。参见例如 BV/TV 比、ES/BS 比和 MS/BS 比。合成代谢作用似乎持续整个给药方案，而抗吸收作用似乎在小鼠中存在时间短些。

[0206] 实施例 3：ActRIIa-mFc 减轻或预防鼠类多发性骨髓瘤鼠模型中的骨损伤

[0207] 多发性骨髓瘤患者表现出骨丢失疾病，以破骨细胞活性增加以及成骨细胞的骨形成减少为特征。小鼠骨髓瘤 5T2MM 模型是基于使用来自某种类型自发性肿瘤的肿瘤细胞（5T2MM 细胞），该自发性肿瘤在老年小鼠中产生，并在小鼠中造成类似于在人多发性骨髓瘤患者中看到的那些作用。例如参见 Vanderkerken et al., Methods Mol Med. 2005 ;113 : 191-205。检测 ActRIIa-mFc 在此模型中的作用。

[0208] 注射入 C57B1/KaLwRij 小鼠的 5T2MM 细胞促进破骨细胞表面的增加，溶骨性病变

的形成,并造成骨面积减少。骨骼疾病与成骨细胞数量、成骨细胞表面的减少和矿化减少有关。

[0209] 携带 5T2MM 细胞的小鼠用 ActRIIa-mFc (RAP-011) (10mg/kg, 腹膜内给药, 每周两次) 或溶剂治疗, 从 5T2MM 注射时开始, 总共 12 周。胫骨近端和腰椎骨的 MicroCT 分析显示, 与首次接受实验的小鼠相比, 携带 5T2MM 的小鼠小梁骨体积降低 39% 和 21% ($p < 0.001$ 和 $p < 0.01$), 小梁骨数量降低 37% 和 15% ($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$)。当与溶剂治疗的小鼠比较时, RAP-011 完全阻止了胫骨 ($p < 0.001$ 和 $p < 0.05$) 和椎骨 ($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$) 中松质骨体积和数量的 5T2MM 诱导的减少。当与首次接受实验的小鼠相比时, RAP-011 治疗小鼠胫骨中骨体积高 19% ($p = 168$), 椎骨中高 12% ($p < 0.05$)。RAP-011 阻止溶骨性骨病变的发展 ($p < 0.05$)。此效果如图 26 所示。虽然在此研究中, 数据的初步评估没有确定对血清病变蛋白 (多发性骨髓瘤肿瘤细胞的生物标志物) 或骨髓瘤负荷有显著影响, 但进一步的分析表明, 除一只治疗动物外全部治疗动物的血清病变蛋白都大大降低, 此外, 健康骨髓的量大幅增加, 表明骨髓瘤肿瘤细胞负荷减少。

[0210] 因此, ActRIIa-mFc 可用于减少多发性骨髓瘤所致的骨骼疾病的影响, 并治疗肿瘤细胞本身。

[0211] 实施例 4: ActRIIa-hFc 蛋白的鉴定

[0212] 采用组织血纤维蛋白溶酶原前导序列 SEQ ID NO:9, ActRIIa-hFc 融合蛋白在 pAID4 载体 (SV40ori/ 增强子, CMV 启动子) 稳定转染的 CHO-DUKX B11 细胞中表达。如上述实施例 1 中纯化的蛋白的序列为 SEQ ID NO:7。Fc 部分是人 IgG1Fc 序列, 如 SEQ ID NO:7 所示。唾液酸分析表明, 所述蛋白质中含有平均每分子 ActRIIa-hFc 融合蛋白约 1.5 至 2.5 摩尔的唾液酸。

[0213] 此纯化的蛋白显示在所有检测动物中非常长的血清半衰期, 包括在人类患者中有 25-32 天的半衰期 (见下面实施例 5)。另外, CHO 细胞表达的物质对活化素 B 配体比报道的对人 293 细胞中表达的 ActRIIa-hFc 融合蛋白有更高的亲和力 (del Re et al., J Biol Chem. 2004Dec17;279(51):53126-35.)。另外, 使用 tPa 前导序列比其他前导序列生成的更多, 并且不像用天然前导序列表达的 ActRIIa-Fc 那样, 提供了高纯度的 N 末端序列。使用天然前导序列得到两种主要种的 ActRIIa-Fc, 每个有不同的 N 末端序列。

[0214] 实施例 5: 人临床试验

[0215] 实施例 4 中描述的蛋白在随机、双盲、安慰剂对照的研究中施用于人类患者, 进行该研究主要是为了评价所述蛋白在健康的绝经后女性中的安全性。48 个受试者随机分为 6 个组群, 接受或者单剂量的 ActRIIa-hFc 或者安慰剂 (5 个活性的: 1 个安慰剂的)。剂量水平的范围从 0.01 至 3.0mg/kg 静脉注射 (IV) 以及 0.03 至 0.1mg/kg 皮下注射 (SC)。所有受试者随访 120 天。如果受试者在 6 个月的研究入围中使用了影响骨骼代谢的药物, 则被排除而不参与研究。对每个组群进行安全性评价, 确定剂量逐步上升。除了药物代谢动力学 (PK) 分析外, ActRIIa-hFc 的生物活性还通过测量骨形成和吸收的生化标志物以及 FSH 水平进行评估。

[0216] 在此研究中未见严重不良反应报道。不良事件 (AEs) 一般是轻微和短暂的。对 AEs 的初步分析包括头痛、化验值升高、感冒症状、呕吐 (emesis) 或呕吐 (vomiting)、静脉内浸润以及注射部位血肿。

[0217] ActRIIa-hFc 的 PK 分析显示剂量的线性曲线图, 平均半衰期为约 25-32 天。ActRIIa-hFc 的曲线下面积 (AUC) 与剂量线性相关, SC 给药后吸收基本完全 (见图 27 和 28)。这些数据表明, SC 是可取的给药办法, 因为它提供药物的等等的生物利用度和血清半衰期, 同时避免静脉给药头几天相关的药物血清浓度峰值 (见图 28)。ActRIIa-hFc 造成合成代谢骨骼生长标记物骨特异性碱性磷酸酯酶 (BAP) 血清水平的快速持续的剂量依赖性增加, 以及骨吸收标记物 C 末端 1 型胶原端肽和抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 水平的剂量依赖性降低。其他标记物如 PINP 显示不确定的结果。BAP 水平显示在药物最高剂量时接近饱和效应, 表明在剂量 0.3mg/kg 时实现对此合成代谢骨骼生物标志物的半数最大效应, 增加的变化最高达 3mg/kg。药物的药效学作用和 AUC 之间的关系推算 EC_{50} 为 51,465 (天 *ng/ml)。见图 29。在检测的最高剂量水平, 这些骨生物标志物的变化持续大约 120 天。也有与活化素抑制相一致的血清 FSH 水平的剂量依赖性降低。

[0218] 给予健康绝经后女性的单剂量 ActRIIa 在检测的剂量水平范围是安全和良好耐受的。长期的 PK 和药效学作用表明, 间歇性给药对未来研究是合适的。举例来说, 基于血清半衰期的给药可按每月一次, 或按每二、三、四、五或六周一次的程度进行。另外, 由于药效学作用的影响远远超出了药物的血清残留, 给药可以基于药效学作用进行, 意味着每三个月给药一次, 或每二、三、四、五、六甚至 12 个月给药一次都可能对患者产生所需效果是有效的。此临床试验表明, 对人而言 ActRIIa-hFc 是有骨形成增加和骨吸收减少的生物学证据的骨合成代谢 (osteoblastic) 药物。

[0219] 实施例 6 :ActRIIa-mFc 和双膦酸盐的联合用药

[0220] 双膦酸盐是一类广泛用于治疗与低骨矿密度相关的疾病, 包括骨质疏松症和癌症有关的骨流失的药物。双膦酸盐具有很强的抗骨吸收活性, 抑制破骨细胞。可能因为骨破裂和骨骼生长都需要破骨细胞, 双膦酸盐似乎减少作为最近已知合成代谢骨骼生长药物之一的甲状旁腺激素 (PTH) 的作用 (Black et al., N Engl J Med. 2003 Sep 25 ;349(13) : 1207-15 ;Samadfam et al., Endocrinology. 2007 Jun ;148(6) :2778-87.)。

[0221] 为检测 ActRIIa 治疗对之前或同时接受双膦酸盐或其他抗吸收治疗的患者的效用, 用组合的 ActRIIa-mFc 和双膦酸盐化合物唑来膦酸对小鼠进行了测试。12 周龄的 C57BL/6N 小鼠作如下处理 :

[0222] 组 1 PBS

[0223] 组 2 ActRIIa-mFc (RAP-011) (10mg/kg) 每周两次 (与组 3 和 4 一起)

[0224] 组 3 唑来膦酸 (ZOL) 单剂量 (20mg/kg)

[0225] 组 4 ZOL (1 剂量), 三天后 ActRIIa-mFc (RAP-011) (1mg/kg) 每周两次

[0226] 组 5 ZOL (1 剂量), 三天后 ActRIIa-mFc (RAP-011) (10mg/kg) 每周两次

[0227] 给药前和治疗 3 和 8 周时, 总 BMD 通过 DEXA 扫描 (PIXI) 测定。

[0228] 如图 30 所示, 总 BMD 在所有治疗组中显著增加, ZOL 和 ActRIIa-mFc 的组合产生最大效用。这些结果表明, ActRIIa-Fc 蛋白可用于增加骨密度, 甚至是在已经接受双膦酸盐治疗的患者中。

[0229] 实施例 7 :ActRIIa-Fc 减轻或预防乳腺癌转移所致的骨丢失

[0230] 据估计, 百分之 65 至 75 的乳癌转移至骨骼, 造成骨结构的重大损害, 增加骨折风险, 并造成疼痛及其他副作用。我们测试了已转移至骨骼的乳腺癌小鼠模型中 ActRIIa 的

作用。

[0231] 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的亚系 (克隆 2287) 体外培养,在密度为 5×10^6 个细胞 /ml 时收集细胞。MDA-MB-231 是非常有能力接种到骨骼并导致类似于骨转移造成的骨损伤的细胞系。在研究第 0 天时,将 10ml 细胞注射到 6 周龄雌性无胸腺裸鼠的胫骨中。研究的第 10 天小鼠接受 ActRIIa-mFc (10mg/kg/ 每周两次 / 皮下) ($n = 8$) 或 PBS 溶剂 ($n = 7$)。每周间隔通过双能量 X 射线吸收分析法 (PIXIMus) 评估疾病进程。小鼠用 ActRIIa-mFc 治疗 4 周,然后处死并收集每只动物的胫骨 (包括肿瘤注射和未肿瘤注射的)。然后处理胫骨并准备 microCT 和组织学分析。

[0232] 与对侧腿相比,无胸腺裸鼠胫骨内注射 MDA-MB-231 细胞促进了被注射胫骨溶骨性病变的发展。胫骨近端 MicroCT 分析显示,与 PBS 溶剂处理小鼠中未注射肿瘤的胫骨相比,带有 MDA-MB-231 的胫骨松质骨体积减少 62%。ActRIIa-mFc 治疗导致了与溶剂组相比,首次接受实验的或携带肿瘤的胫骨分别增加 70% 或 147% (两者 $P < 0.01$)。ActRIIa-mFc 治疗小鼠的携带肿瘤的胫骨与 VEH 处理小鼠的首次接受实验的胫骨有类似的小梁骨密度 ($p = 0.39$)。

[0233] 因此,ActRIIa-mFc 能消除与骨骼中存在乳腺肿瘤细胞有关的骨损伤。

[0234] 实施例 8 : 可选择的 ActRIIa-Fc 蛋白

[0235] 可选择的构建物可能有 C 末端尾部的缺失 (ActRIIa 胞外结构域的最后 15 个氨基酸)。这样的构建物的序列如下 (Fc 部分加下划线) (SEQ ID NO :12) :

[0236] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0237] 引作参考

[0238] 本文所提到的所有出版物和专利特此全部引作参考,好像每个出版物或专利明确且单独地表明引作参考。

[0239] 尽管已经讨论过目标事物的具体实施例,但是以上说明书是举例说明性的而非限制性的。通过阅读此说明书和下面的权利要求,许多变化对于本领域技术人员而言是显而易见的。本发明全部范围应当参照权利要求及其等同的全部范围,和本说明书及这样的变化确定。

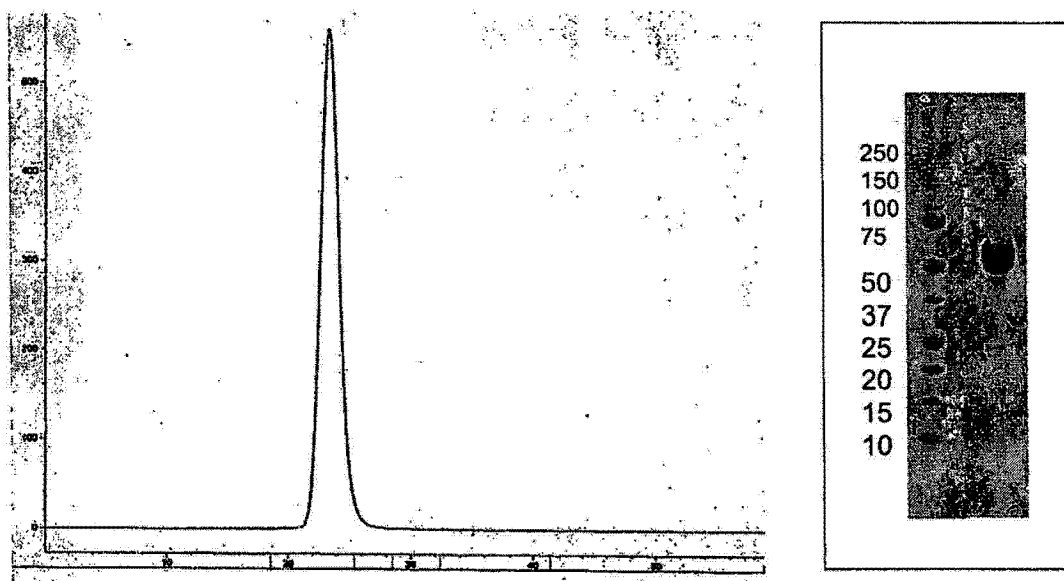


图 1

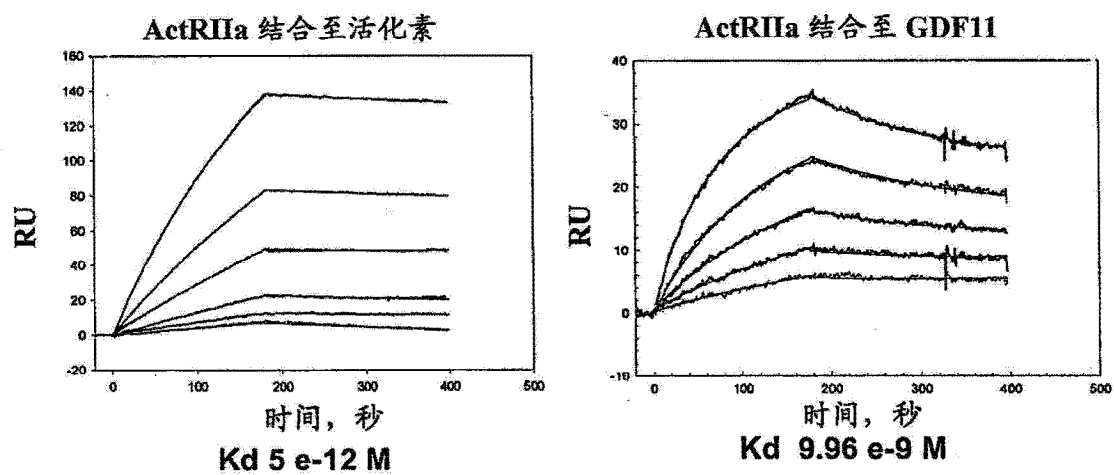


图 2

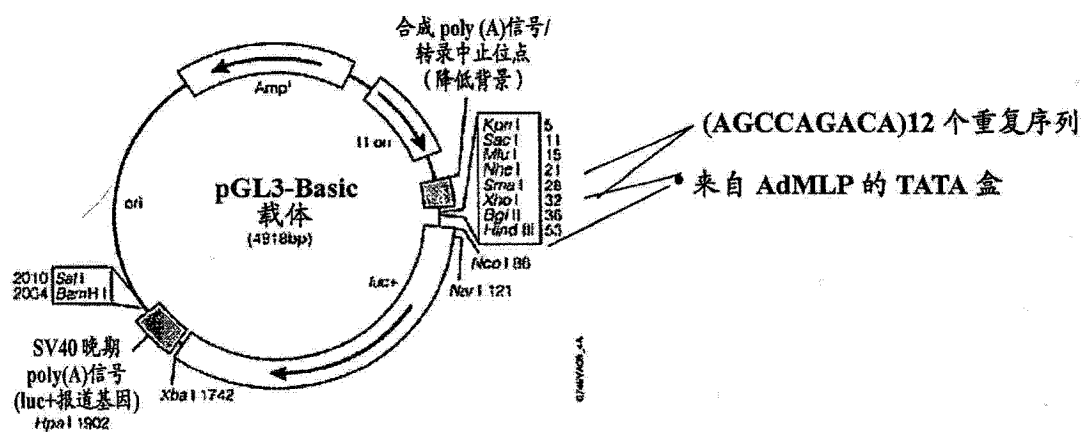


图 3

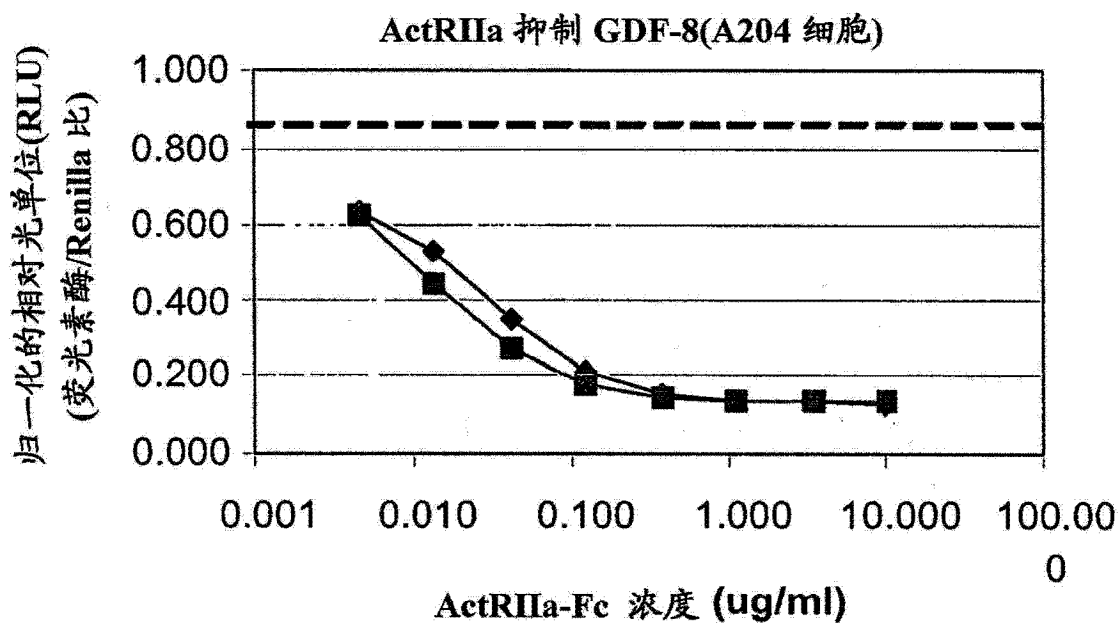


图 4

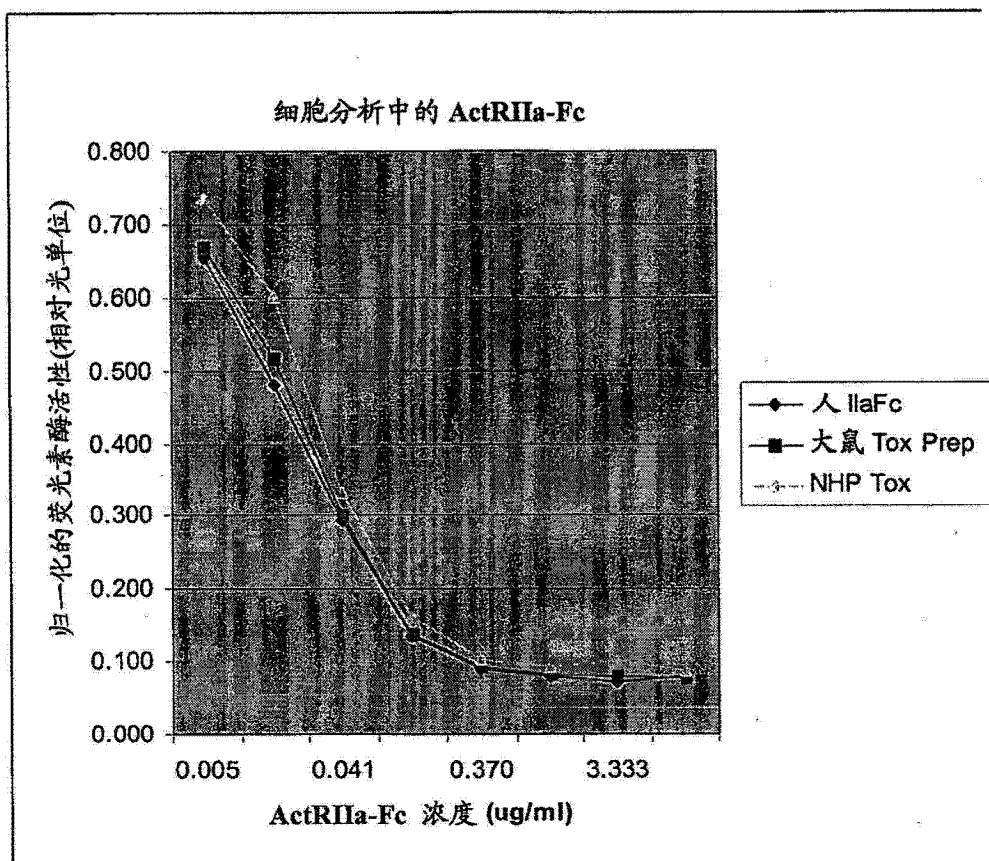


图 5

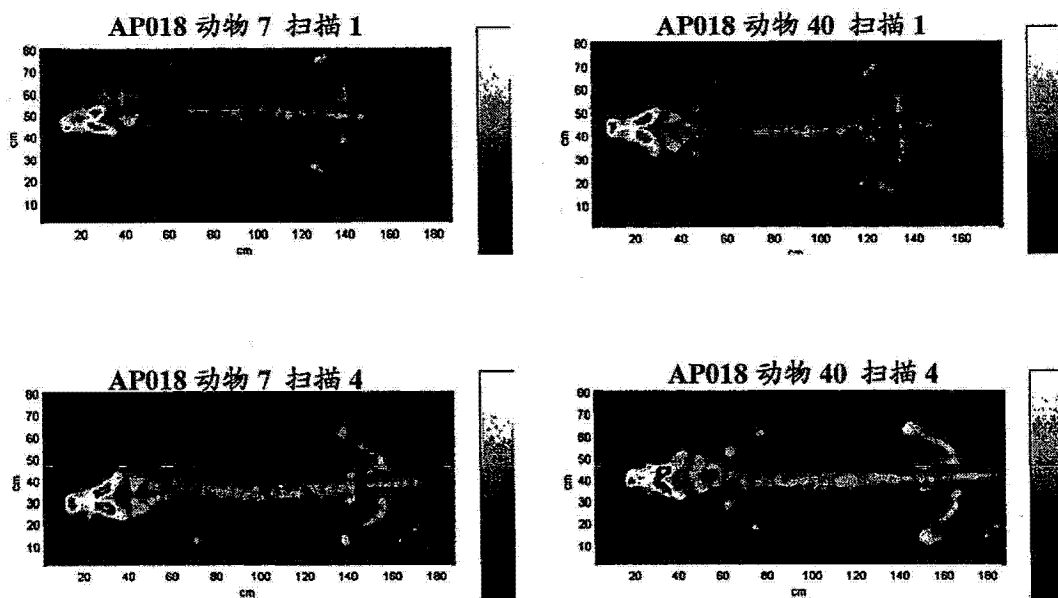


图 6

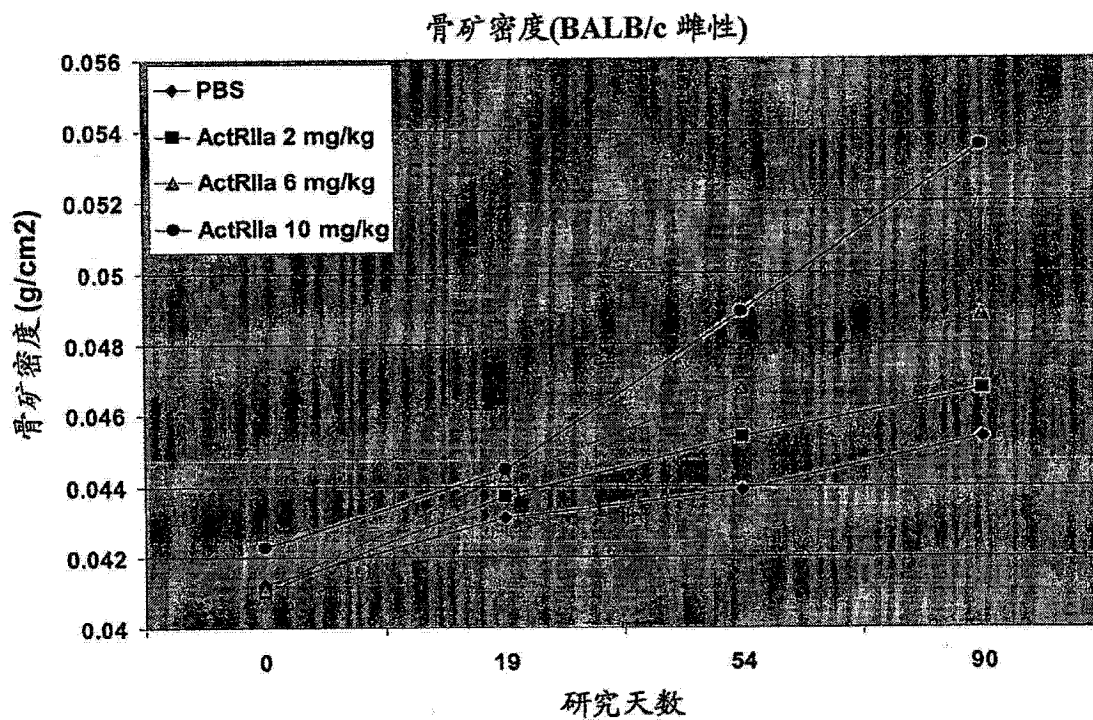


图 7

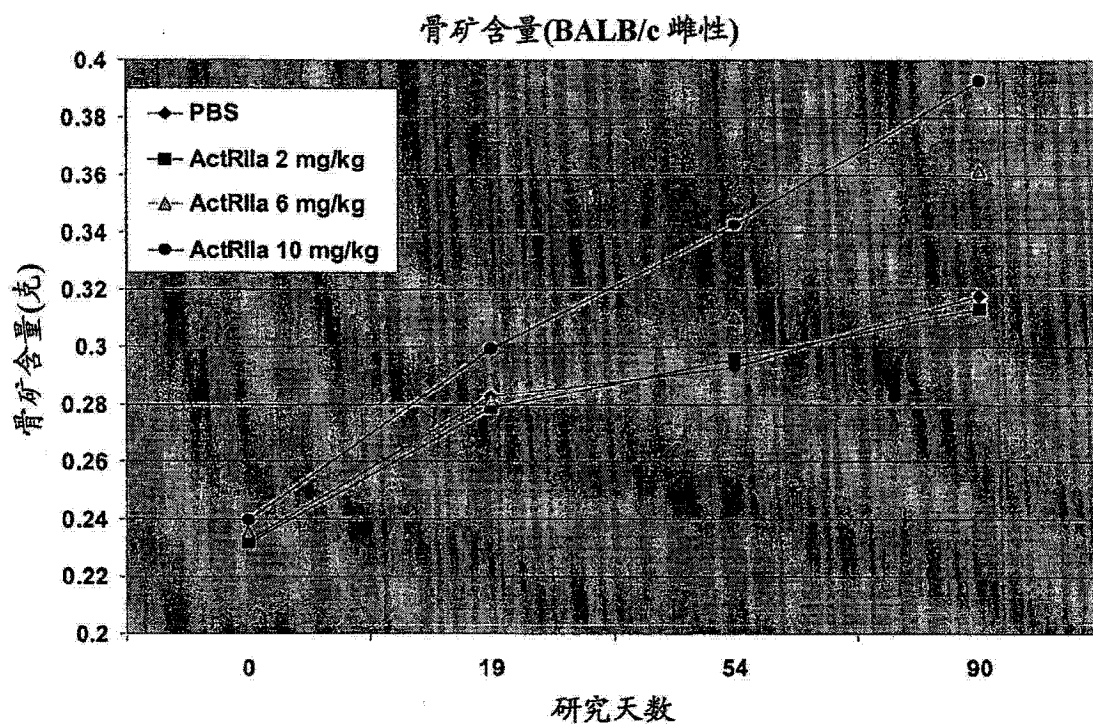


图 8

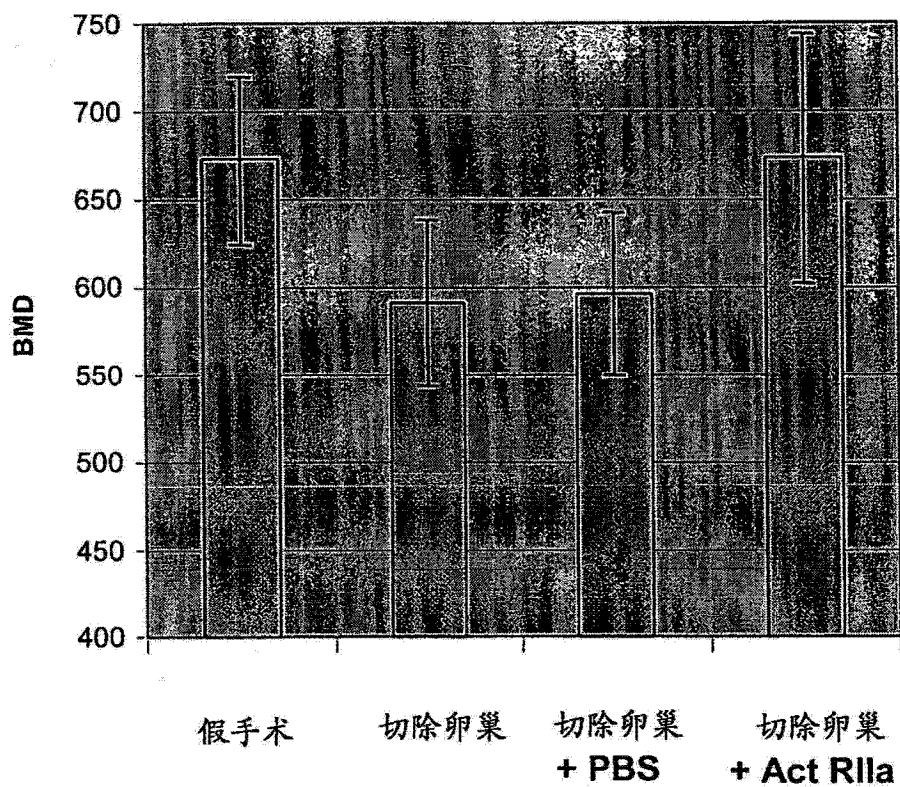


图 9

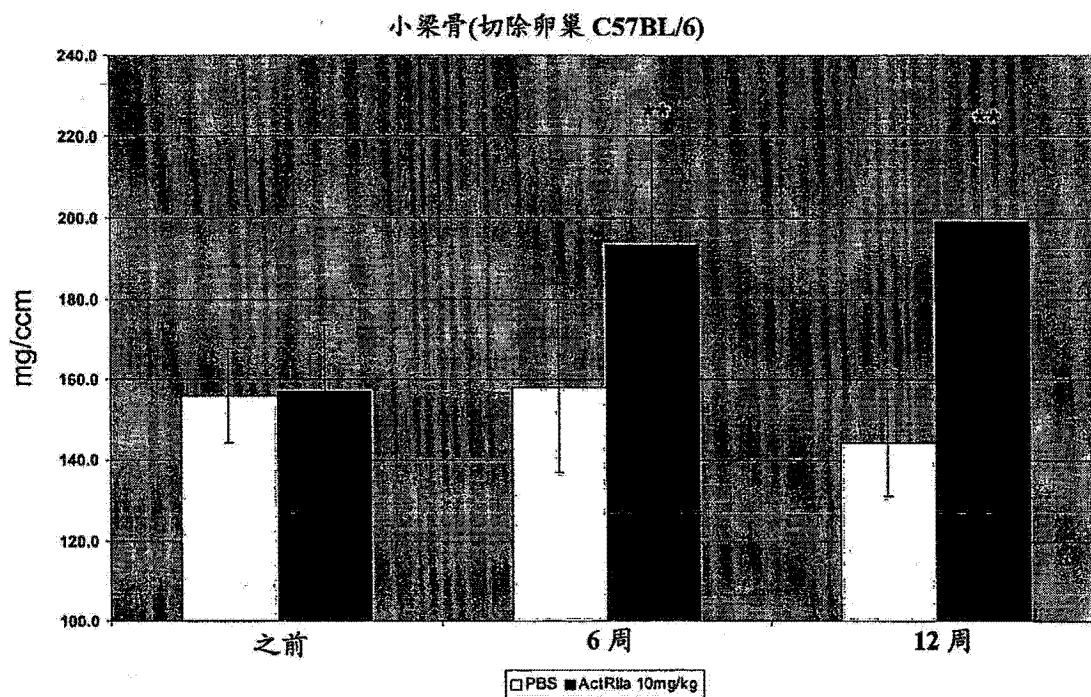


图 10

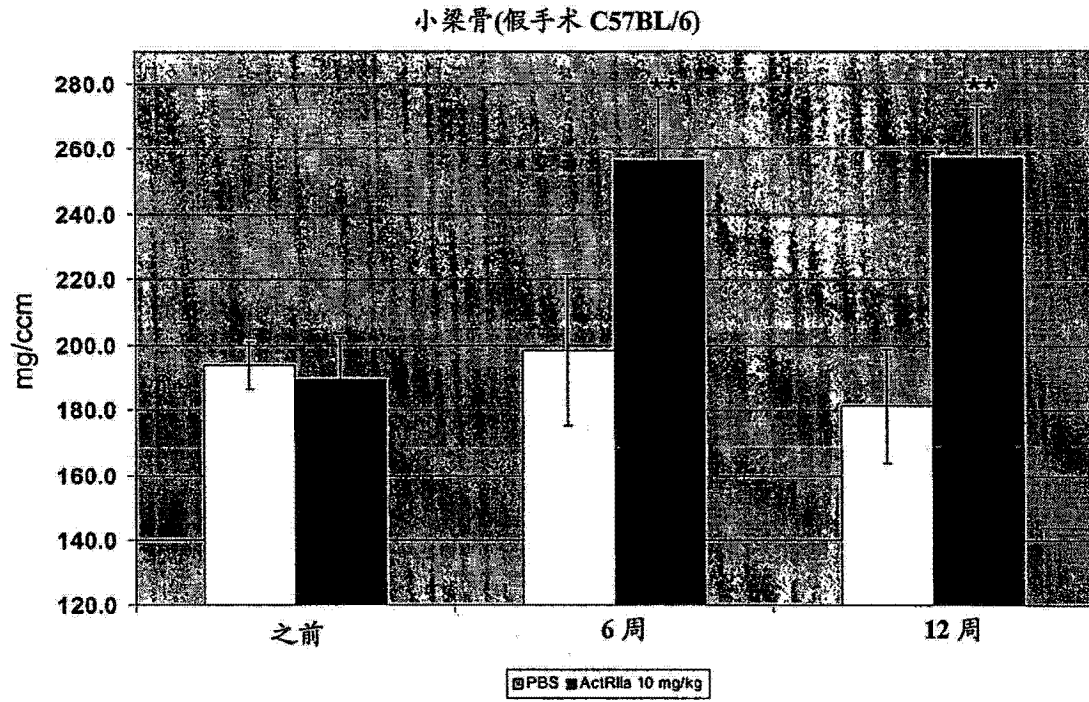


图 11

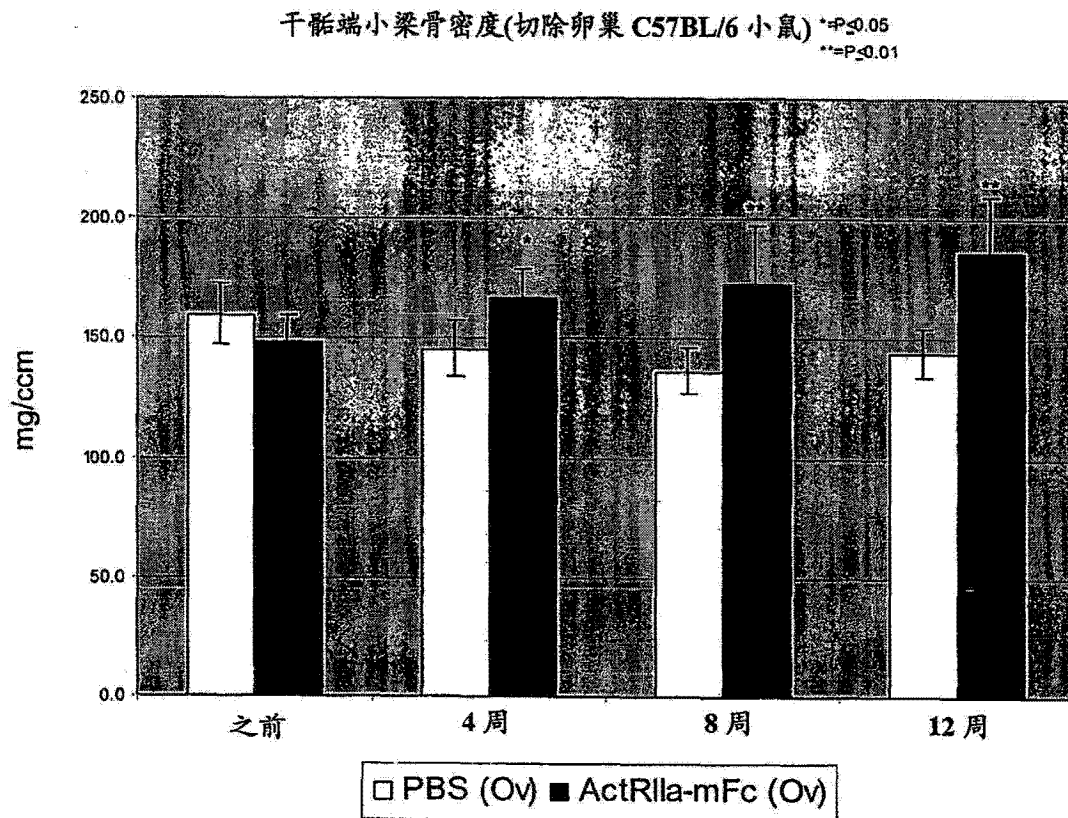


图 12

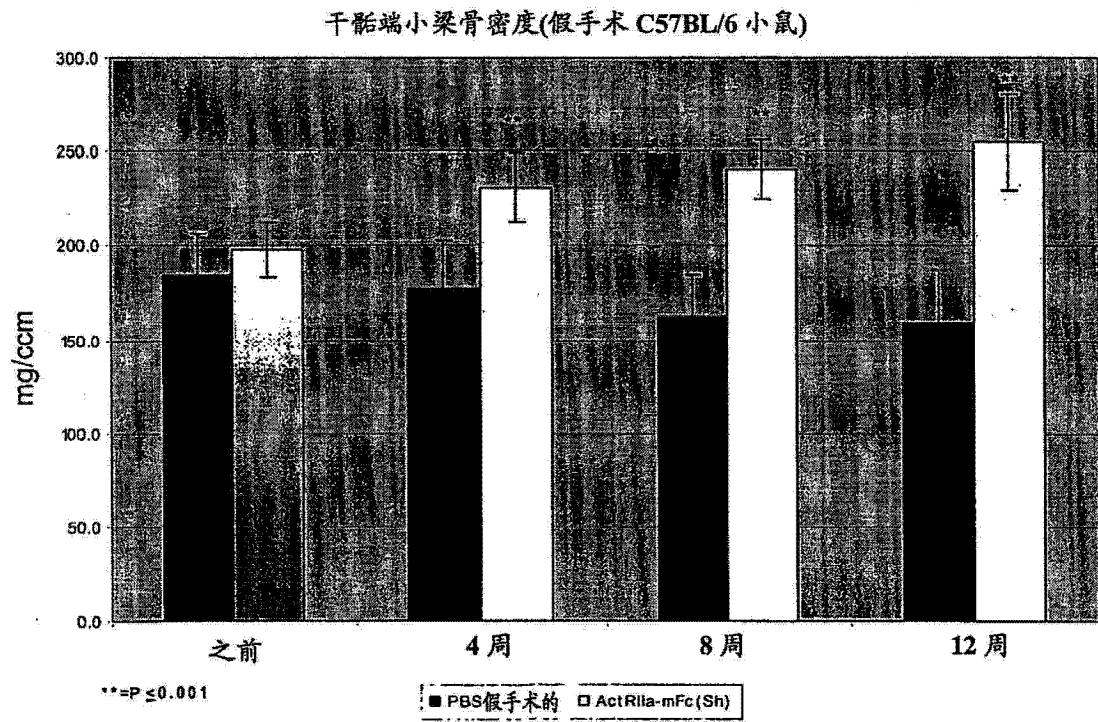


图 13

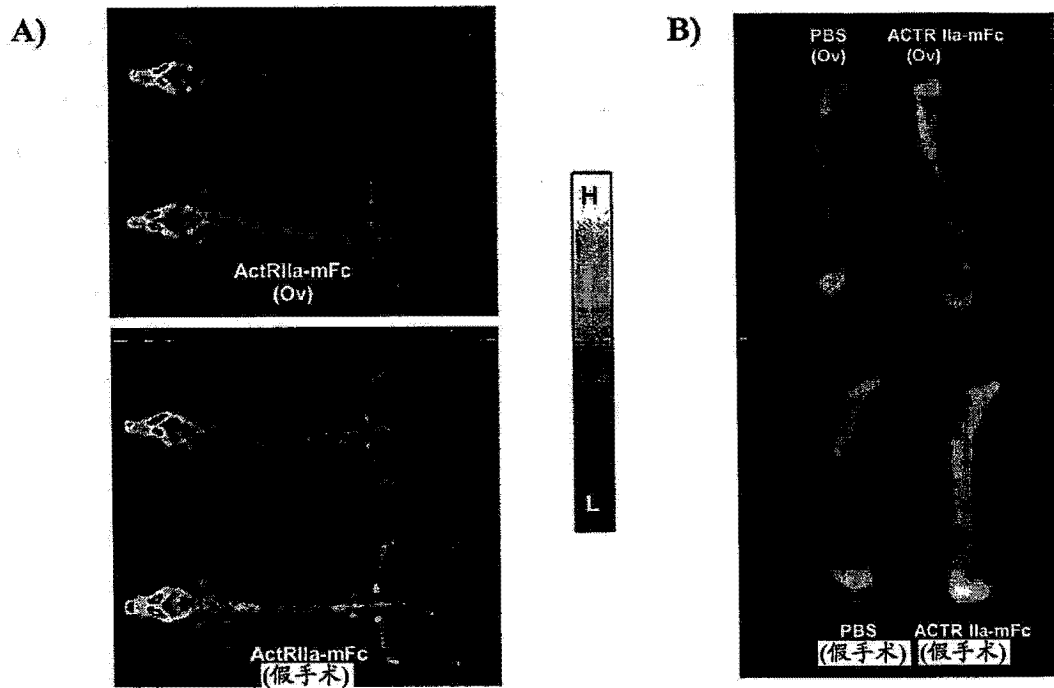


图 14

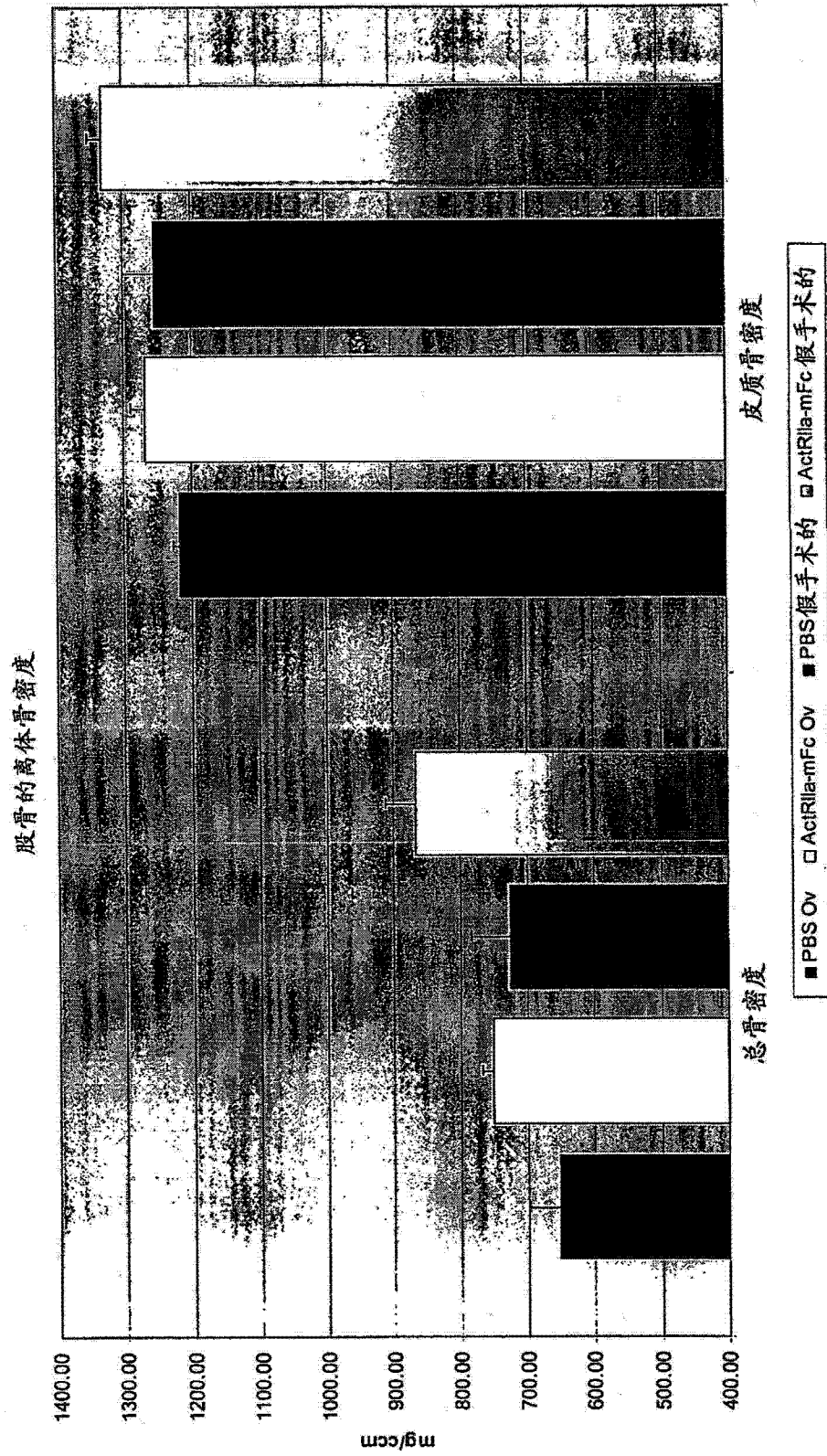


图 15

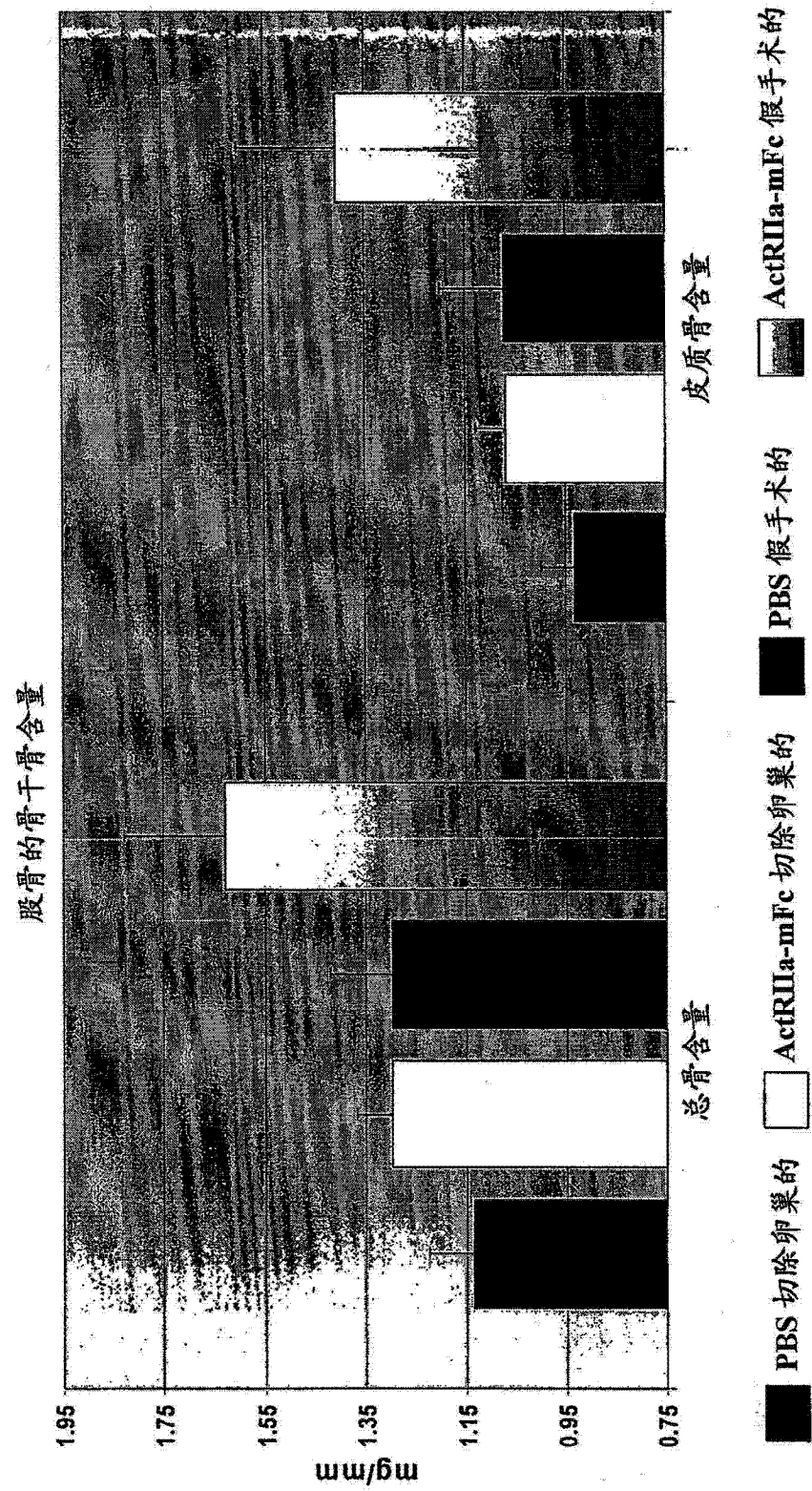


图 16

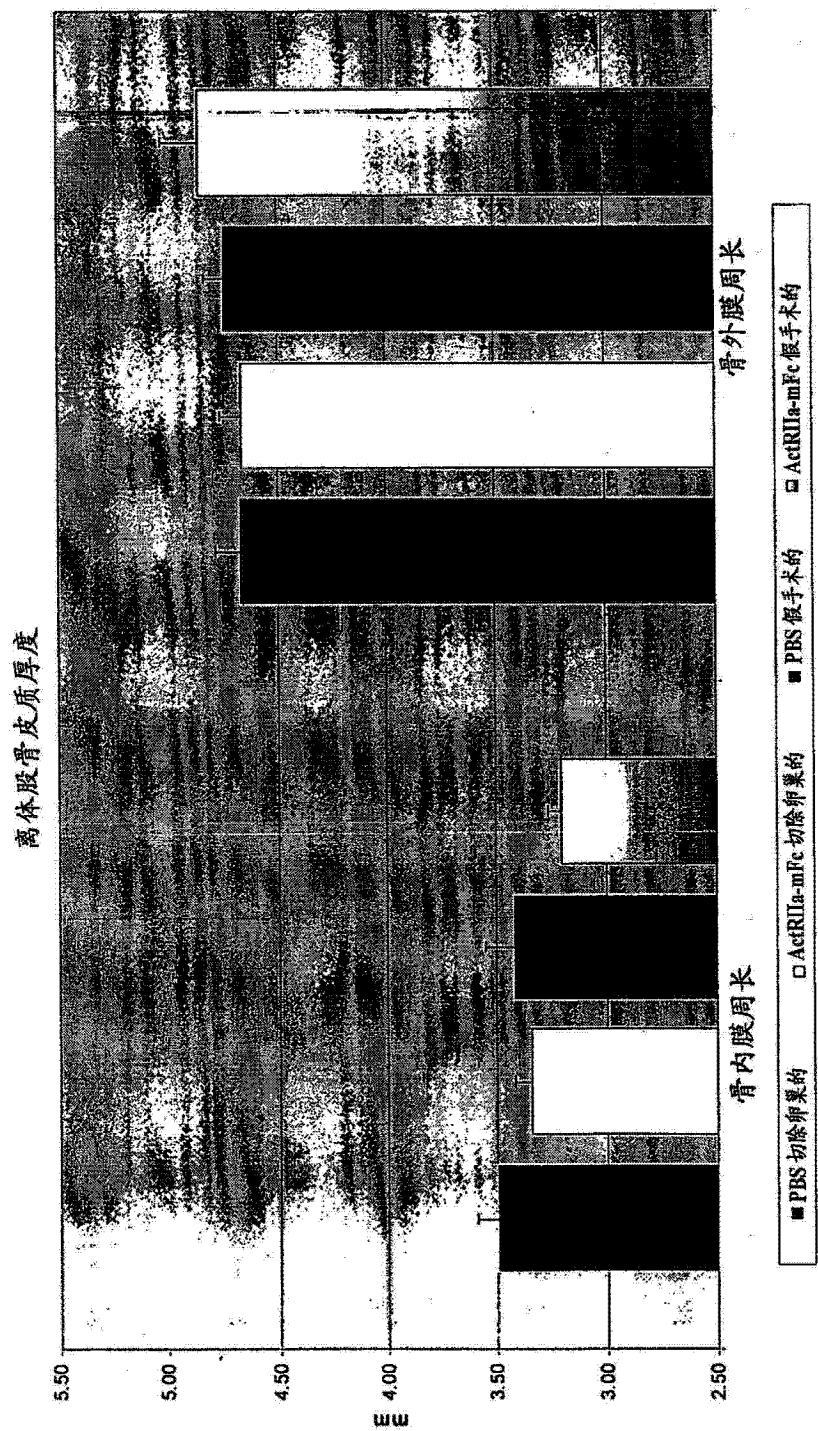


图 17

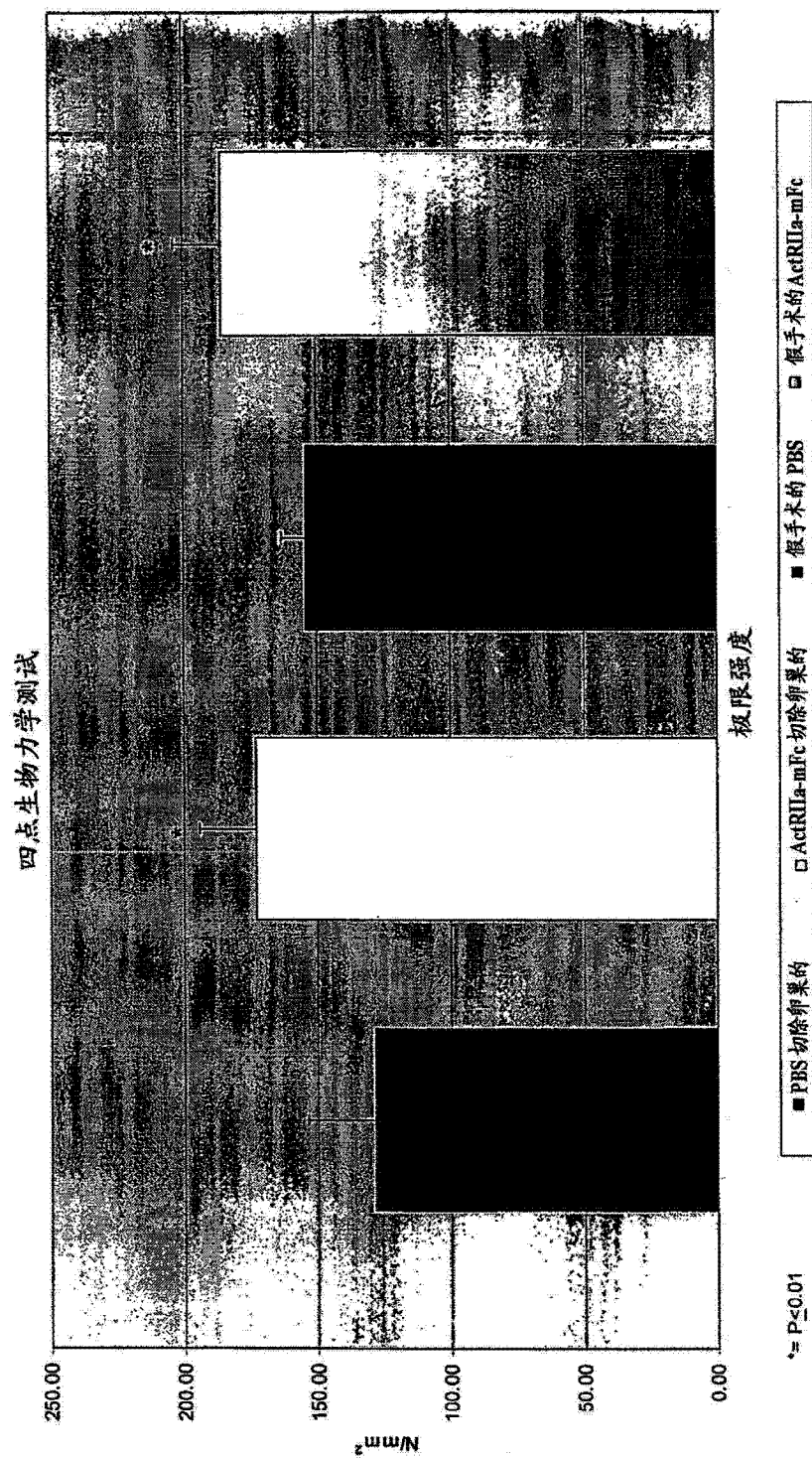


图 18

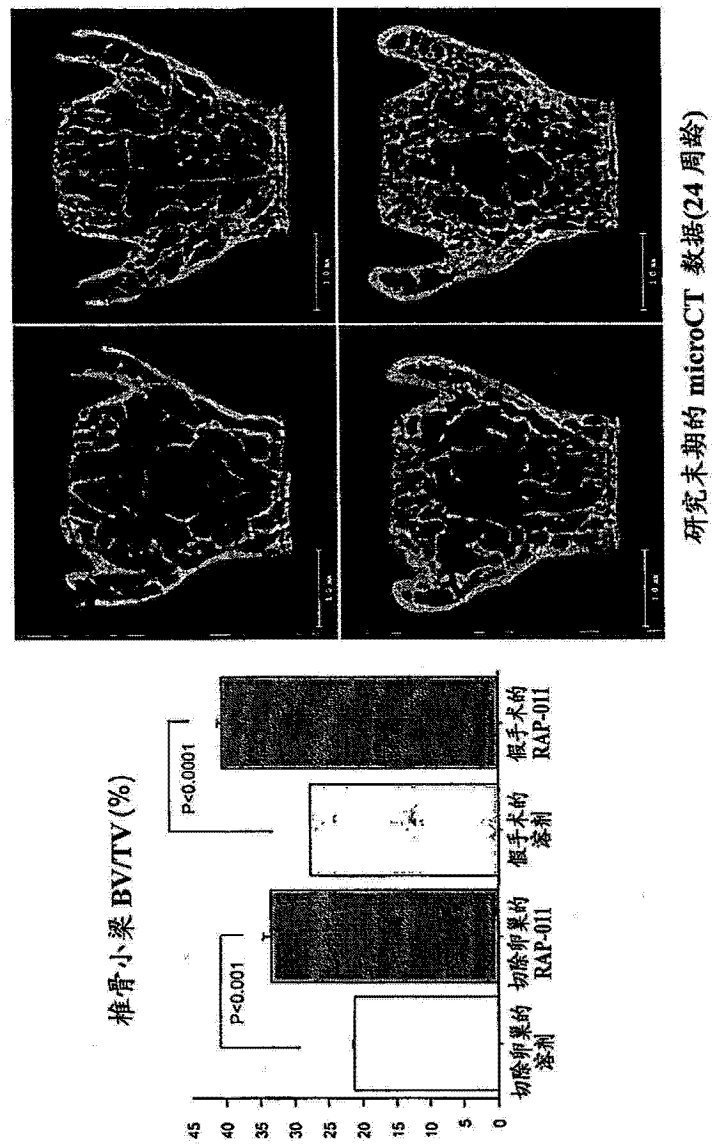


图 19

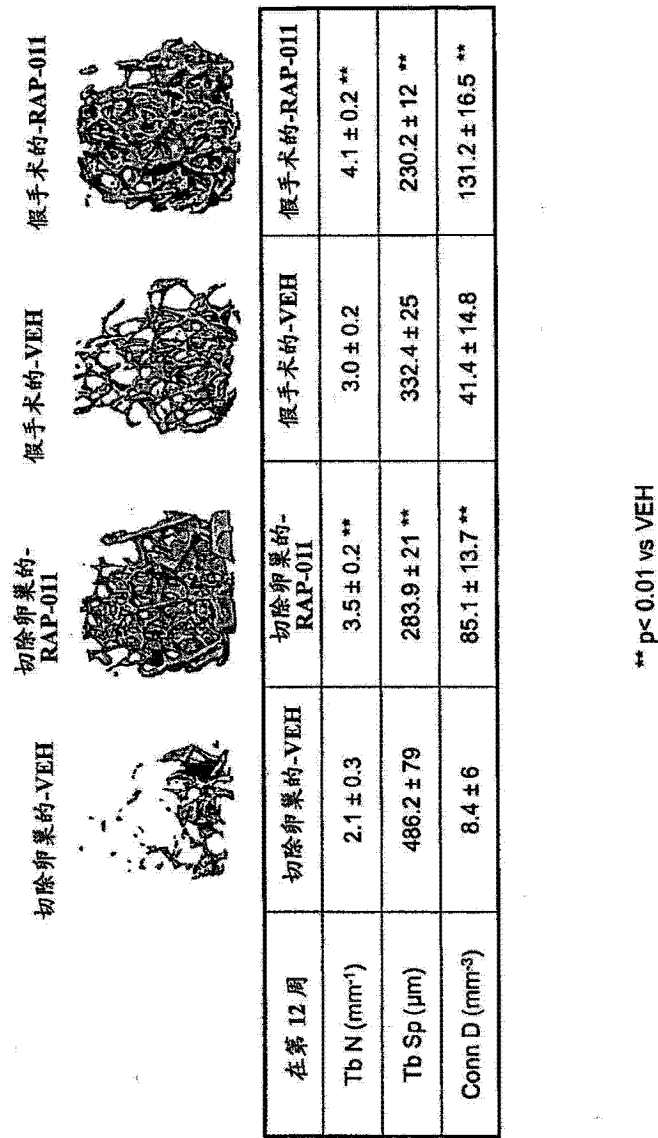


图 20

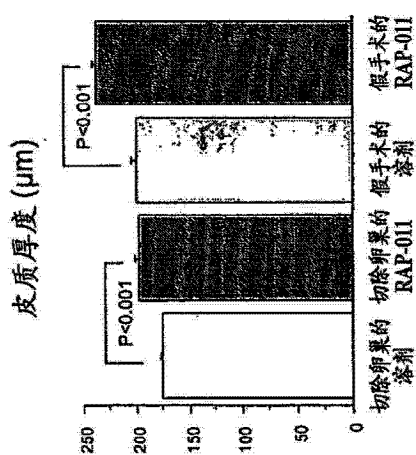
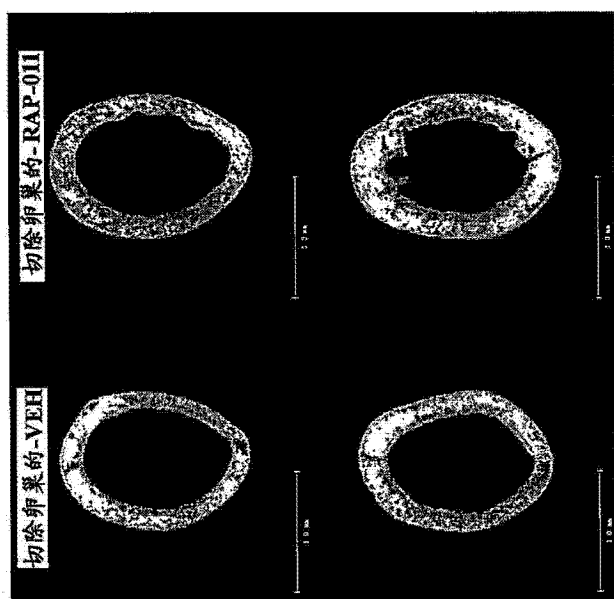
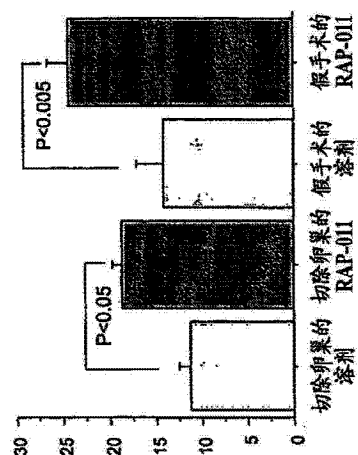


图 21

股骨断裂能(energy-to-failure) (N·mm)



椎骨断裂能(energy-to-failure) (N·mm)

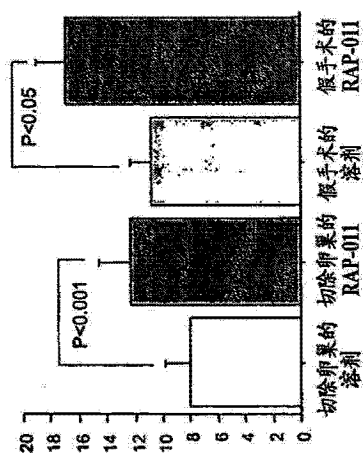


图 22

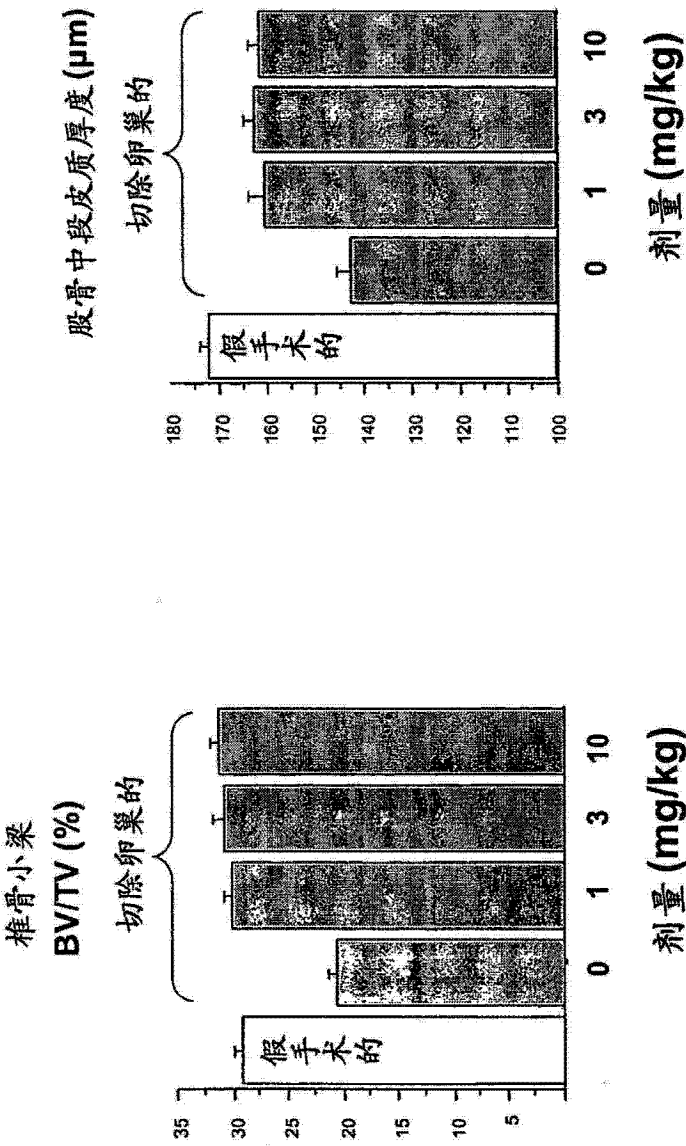


图 23

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/Bs (%)	MAR (um/天)	BFR/BSd (um ³ /um ² /天)
PBS 均值	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011 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

参数	2 周 VEH (N=6)	2 周 RAP-011 (N=6)	4 周 VEH (N=6)	4 周 RAP-011 (N=6)	6 周 VEH (N=8)	6 周 RAP-011 (N=8)	12 周 VEH (N=6)	12 周 RAP-011 (N=6)
骨体积(BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.45 *	7.04 ± 0.51	15.57 ± 1.39 *	6.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53 *	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08 *
骨样表面(OS/BS), %	4.86 ± 0.34	5.32 ± 0.49	3.95 ± 0.51	3.65 ± 0.36	3.26 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
侵蚀表面(ES/BS), %	17.36 ± 0.99	13.93 ± 0.96 *	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.38 ± 1.31	11.89 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
成骨细胞数量/面积(Ob/Tar), no./mm	429.89 ± 25.33	455.31 ± 28.29	411.84 ± 44.61	567.78 ± 53.13 *	405.22 ± 24.2	634.61 ± 35.39 *	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77 *
成骨细胞表面/骨表面(Obs/BS), %	36.12 ± 2.42	29.43 ± 1.52 *	33.5 ± 2.53	29.14 ± 1.93	35.5 ± 1.27	35.92 ± 1.29	28.45 ± 1.32	30.24 ± 1.5
骨周缘上的成骨细胞(Nob/BPm), %	49.33 ± 2.52	40.89 ± 1.46 *	48.52 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.26	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53
成骨细胞数量/面积(Oc/Tar), no./mm	65.81 ± 4.97	59.62 ± 5.89	51.42 ± 3.58	65.68 ± 8.18	45.23 ± 3.98	62.95 ± 5.18 *	28.07 ± 1.85	61.15 ± 1.87 *
骨周缘上的成骨细胞(Noc/BPm), %	7.55 ± 0.53	5.34 ± 0.45 *	6.25 ± 0.66	4.78 ± 0.59	5.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
成骨细胞表面/骨表面(Ocs/BS), %	8.78 ± 0.78	5.23 ± 0.5 *	6.88 ± 0.67	5.36 ± 0.62	6.38 ± 0.67	5.8 ± 0.46	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
骨小梁厚度(TbTh), -m	13.59 ± 0.48	15.42 ± 0.45 *	13.11 ± 0.46	17.68 ± 0.75 *	12.04 ± 0.5	17.28 ± 0.35 *	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02 *
骨小梁间隙(TbSp), -m	167.74 ± 5.88	127.57 ± 7.25 *	175.98 ± 9.3	98.61 ± 6.95 *	187 ± 7.13	104.26 ± 3.42 *	251.79 ± 18.14	98.07 ± 4.27 *
骨小梁数量(TbN), no./mm	5.55 ± 0.19	7.09 ± 0.36 *	5.34 ± 0.23	8.73 ± 0.5 *	5.07 ± 0.18	8.27 ± 0.22 *	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29 *
矿化表面(MS/BS), %	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73 *	4.15 ± 1.02	8.84 ± 0.77 *	3.6 ± 0.56	7.97 ± 0.73 *	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51 *
矿质结合速率(mm/天)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.028 *	0.566 ± 0.042	0.642 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.602 ± 0.016 *	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013 *
骨形成速率(-m3/um2/天)	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.008 *	0.025 ± 0.008	0.057 ± 0.005 *	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004 *	0.016 ± 0.002	0.035 ± 0.002 *

图 25

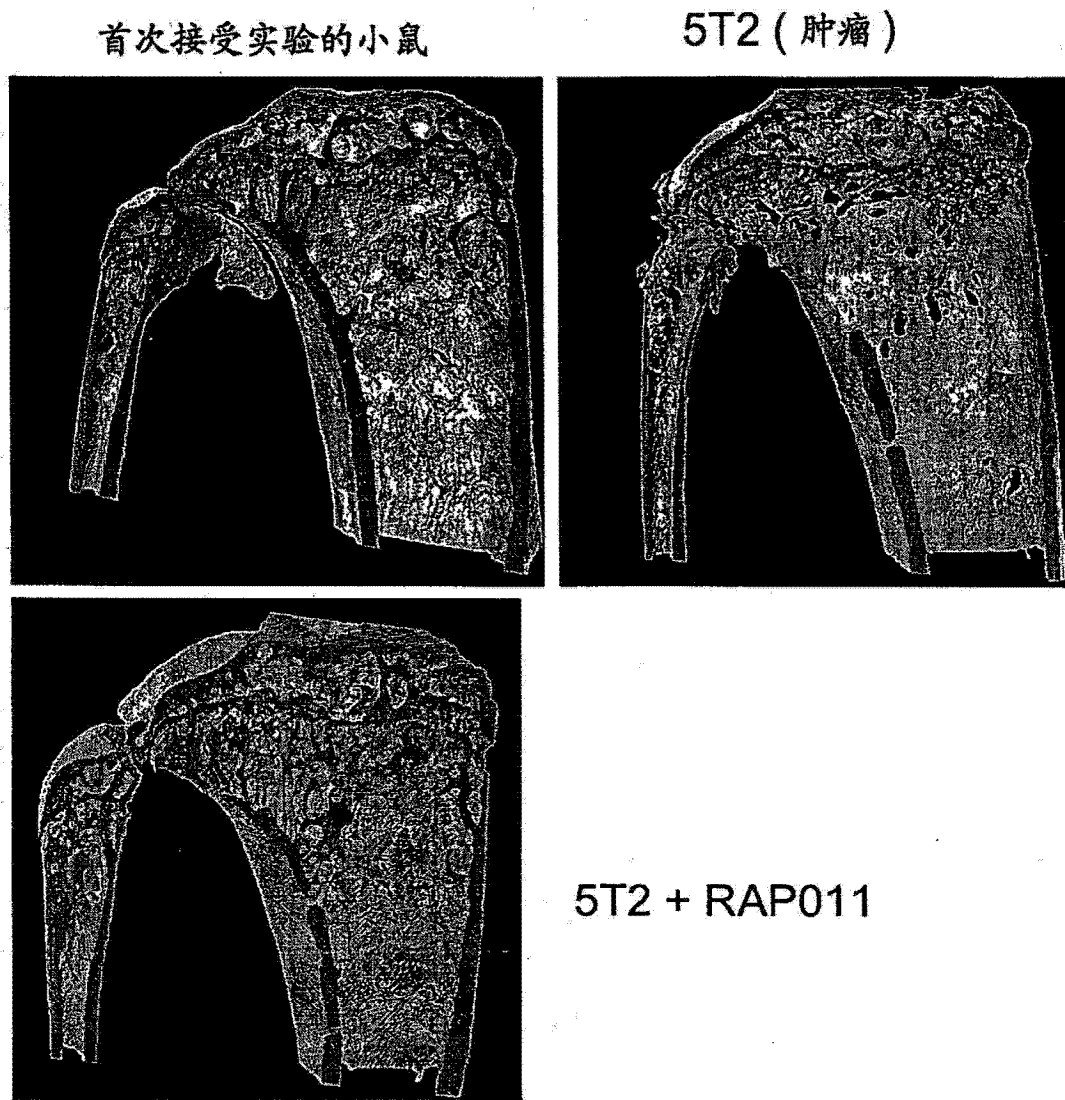


图 26

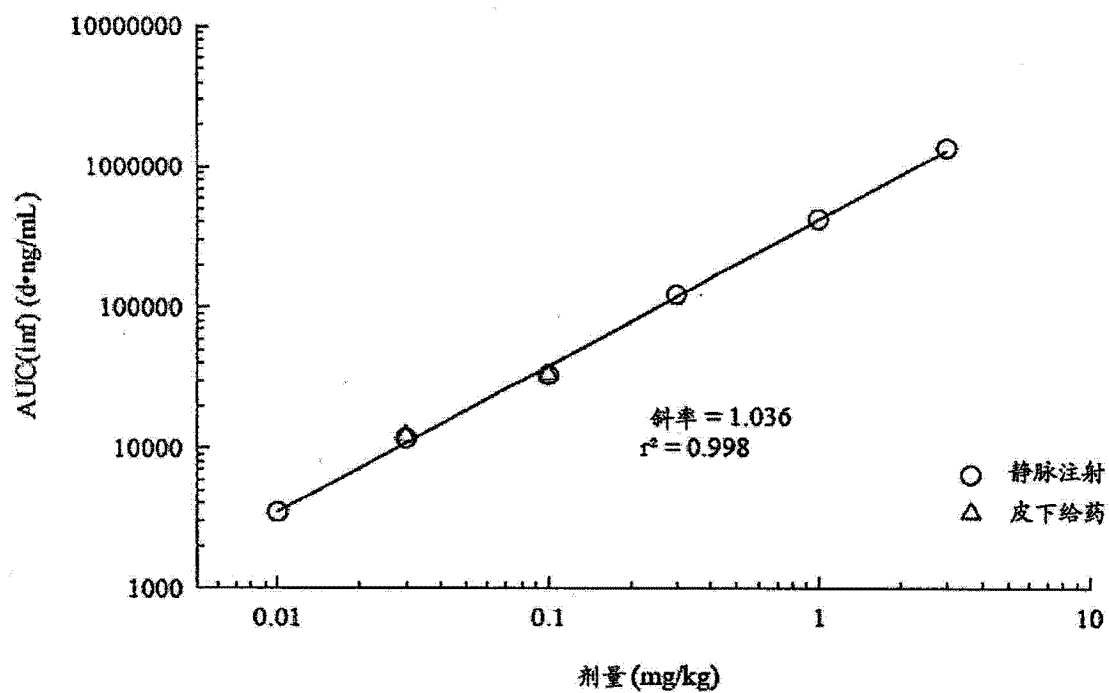


图 27

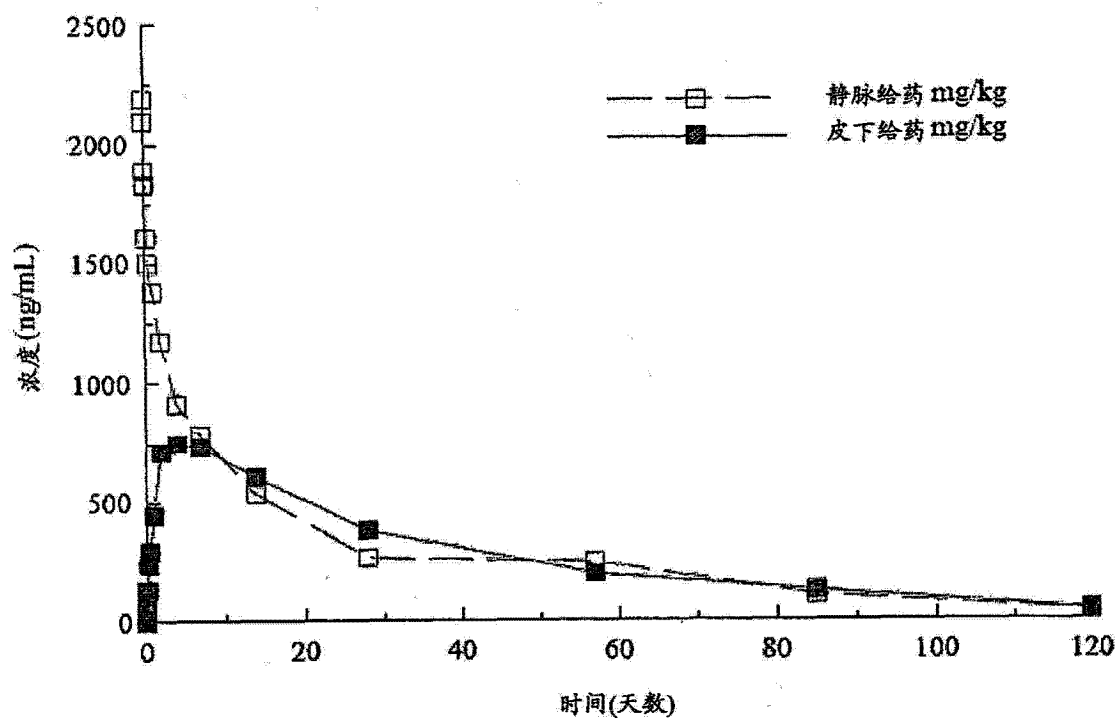


图 28

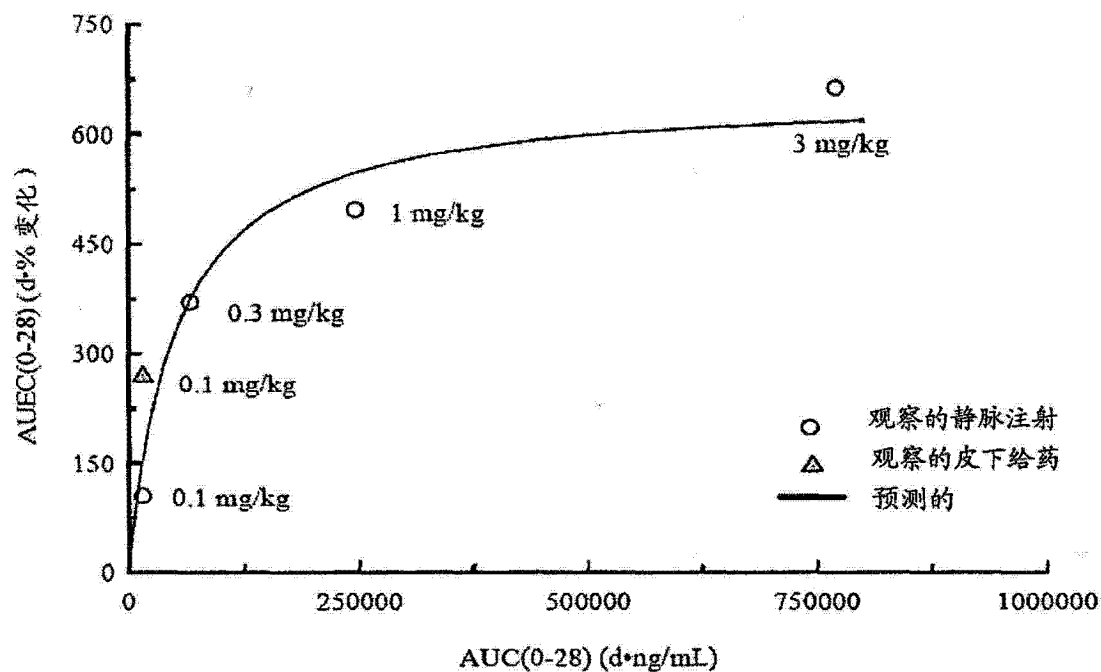


图 29

总 BMD (PIXI)

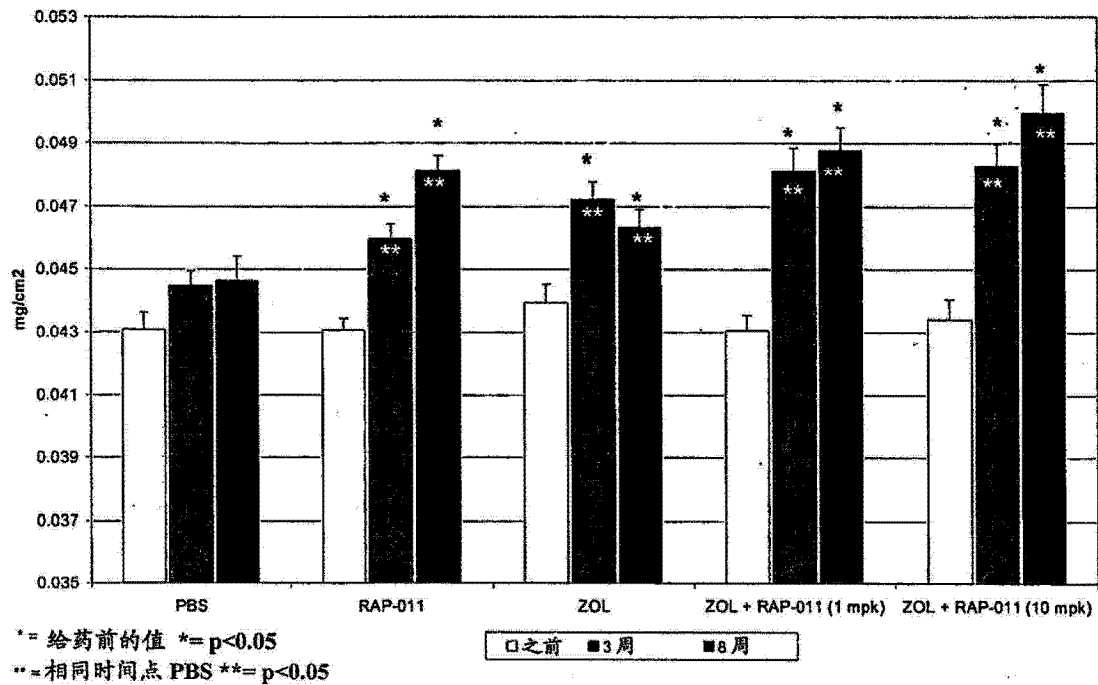


图 30