



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105229028 B

(45)授权公告日 2019.11.08

(21)申请号 201480028990.8

(22)申请日 2014.03.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105229028 A

(43)申请公布日 2016.01.06

(30)优先权数据

61/803,647 2013.03.20 US

61/875,399 2013.09.09 US

61/883,151 2013.09.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/031279 2014.03.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/153435 EN 2014.09.25

(73)专利权人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 贝勒医学院

(72)发明人 B·李 K·T·桑帕思

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/22(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 19/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1835968 A, 2006.09.20,
WO 2006086469 A2, 2006.08.17,
J R Dasch et al.. Monoclonal
antibodies recognizing transforming
growth factor-beta. Bioactivity
neutralization and transforming growth
factor beta 2 affinity purification.《J
Immunol》.1989,第142卷(第3期),1536-1541.
James R Edwards et al.. Inhibition of
TGF- β signaling by 1D11 antibody
treatment increases bone mass and quality
in vivo.《JOURNAL OF BONE AND MINERAL
RESEARCH》.2010,第25卷(第11期),2419-2426.

审查员 李翠莹

权利要求书2页 说明书31页

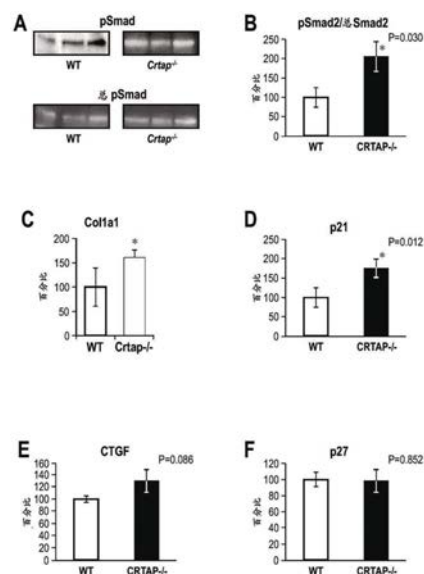
序列表16页 附图27页

(54)发明名称

用于治疗成骨不全的方法

(57)摘要

本发明提供用于在受试者中治疗和改善成骨不全(OI)的症状的方法,所述方法通过给所述受试者施用治疗有效量的结合转化生长因子 β (TGF β)的结合剂进行。



1. 特异性结合并且中和人转化生长因子 β (TGF β) TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3的抗体或其抗原结合片段在制备用于在有需要的受试者中治疗成骨不全 (OI) 的药物中的用途。

2. 权利要求1的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区, 所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的三个互补决定区 (CDR); 以及包含轻链可变区, 所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列的三个CDR。

3. 权利要求1的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区, 所述重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 以及包含轻链可变区, 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

4. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段还包含人IgG4恒定区。

5. 权利要求4的用途, 其中所述人IgG4恒定区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

6. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段还包含人 κ 轻链恒定区。

7. 权利要求6的用途, 其中所述人 κ 轻链恒定区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

8. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段还包含人IgG4恒定区, 和人 κ 轻链恒定区。

9. 权利要求8的用途, 其中所述人IgG4恒定区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列, 且所述人 κ 轻链恒定区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

10. 权利要求1的用途, 其中所述抗体包含重链, 所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

11. 权利要求10的用途, 其中所述抗体包含轻链, 所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

12. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体包含重链, 所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列; 以及包含轻链, 所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

13. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段改善骨参数, 所述骨参数选自骨体积密度 (BV/TV)、总骨表面积 (BS)、骨表面积密度 (BS/BV)、小梁数目 (Tb.N)、小梁厚度 (Tb.Th)、小梁间隙 (Tb.Sp) 和总体积 (Dens TV)。

14. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段减少骨吸收的血清标志物, 所述骨吸收的血清标志物选自尿羟基脯氨酸、尿总吡啶诺林 (PYD)、尿游离脱氧吡啶诺林 (DPD)、尿I型胶原交联的N-端肽 (NTX)、尿或血清I型胶原交联的C-端肽 (CTX)、骨涎蛋白 (BSP)、骨桥蛋白 (OPN) 和酒石酸盐抗性酸性磷酸酶5b (TRAP)。

15. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段增加骨沉积血清标志物, 所述骨沉积血清标志物选自总碱性磷酸酶、骨特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白和I型前胶原。

16. 权利要求15的用途, 其中所述I型前胶原是C-端/N-端I型前胶原。

17. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段抑制骨吸收。

18. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段促进骨沉积。

19. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段改善受OI影响的肺的功能。

20. 结合并且中和人转化生长因子 β (TGF β) TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3的抗体或其抗原结合片段在制备用于在有需要的受试者中治疗成骨不全 (OI) 的药物中的用途,其中所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

21. 结合并且中和人转化生长因子 β (TGF β) TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3的抗体或其抗原结合片段与至少一种治疗剂组合在制备用于在有需要的受试者中治疗成骨不全 (OI) 的药物中的用途。

22. 权利要求21的用途,其中所述治疗剂选自下组:双膦酸盐、甲状旁腺激素或甲状旁腺激素类似物、降钙素和选择性雌激素受体调节剂。

23. 用于权利要求22的用途的抗体或其抗原结合片段,其中所述双膦酸盐选自:阿屈膦酸盐 (alendronate)、帕米膦酸盐 (pamidronate)、伊班膦酸盐 (ibandronate)、羟乙膦酸盐 (etidronate)、氯屈膦酸盐 (clodronate)、唑来膦酸盐 (zoledronate)、替鲁膦酸盐 (tiludronate)、奈立膦酸盐 (neridronate)、奥帕膦酸盐 (olpadronate) 和利塞膦酸盐 (risedronate)。

24. 权利要求22的用途,其中所述治疗剂是甲状旁腺激素或甲状旁腺激素类似物。

25. 权利要求24的用途,其中所述受试者患有I型成骨不全 (type I OI)。

用于治疗成骨不全的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请涉及2013年3月20日提交的美国临时专利申请No.61/803,647,2013年9月9日提交的美国临时专利申请No.61/875,399,和2013年10月26日提交的美国临时专利申请No.61/883,151,其各自内容整体通过引用并入本文。

[0003] 政府资金

[0004] 本发明得到国立卫生研究院颁发的P01 HD070394、P01 HD22657&R01DE01771的政府资助。美国政府拥有本发明的某些权益。

发明领域

[0005] 本发明涉及用于治疗成骨不全(OI)的方法。更具体地,本发明涉及使用特异性结合人转化生长因子 β (TGF β)或其同种型(isoform)的结合蛋白(如抗体或其抗原结合片段)治疗OI的方法。

[0006] 背景

[0007] 成骨不全(OI),也已知为“脆骨病”或“洛布斯坦综合征”,是使人虚弱的和罕见的先天性骨病,其大约每15000人中影响一人。尽管OI类型之间的表型不同,共同的症状包括骨和牙的不完全骨化、减少的骨量、脆骨和病理性骨折。OI的这些共同的症状被认为是由于基因突变引起,所述基因突变导致I型胶原或参与骨基质沉积或稳态平衡的其它蛋白的缺乏。由于这些症状以及致死骨折和并发症的倾向,OI患者的预期寿命与一般人群相比是降低的。因此,本领域中显然存在开发对OI的有效治疗的迫切需要。

[0008] 附图简述

[0009] 图1A(蛋白印迹)和1B-1F(图表)阐明与野生型对照相比,在来自Crtp^{-/-}小鼠的骨中的TGF β 信号传导升高。

[0010] 图2A(荧光图)和2B-C(图表)显示和TGF β 报道子(reporter)小鼠杂交的Crtp^{-/-}小鼠与野生型对照相比展现更高的TGF β 活性。

[0011] 图3是来自用小鼠泛特异性(pan-specific)抗-TGF β 抗体1D11处理的Crtp^{-/-}小鼠的椎骨的 μ CT图像。

[0012] 图4是含有来自用小鼠泛特异性抗-TGF β 抗体1D11处理的Crtp^{-/-}小鼠的椎骨的定量测量的图表。

[0013] 图5是来自用小鼠泛特异性抗-TGF β 抗体1D11处理的Crtp^{-/-}小鼠的椎骨的组织形态测定分析。

[0014] 图6A和6B是阐明来自用小鼠泛特异性抗-TGF β 抗体1D11处理的Crtp^{-/-}小鼠的股骨的生物力学特性的图表(图6A-最大负荷,和图6B-刚度),其由三点弯曲测试确定。

[0015] 图7A和7B(显微图像)和7C(图表)阐明用小鼠泛特异性抗-TGF β 抗体1D11处理的Crtp^{-/-}小鼠的肺表型。

[0016] 图8是用抗-核心蛋白多糖(decorin)抗体染色的Crtp^{-/-}和WT肺的显微图像。

[0017] 图9是描述核心蛋白多糖结合测定的图表。

[0018] 图10是显示Crtap^{-/-}小鼠中增加的TGFβ信号传导的一组图表、照片和图像。图10A是显示TGFβ靶基因p21、PAI-1、和Col1a1的定量RT-PCR结果的一系列三个图表。所述图表表明P3WT和Crtap^{-/-}小鼠的颅盖骨中增加的TGFβ信号传导。结果显示为WT组平均值±SD的倍数变化;每组n=5,*p<0.05。图10B是P3颅盖蛋白提取物的蛋白印迹分析的照片,其显示Crtap^{-/-}相比于WT小鼠,其中活化的Smad2相对于总Smad2蛋白的增加的量,提示增加的TGFβ-信号传导;每组n=3。图10C是显示图10B所示蛋白印迹的定量的图表。结果显示为WT组平均值±SD的倍数变化,*p<0.05。图10D是显示与和TGFβ-报道子小鼠(SBE-Luc小鼠)杂交的WT小鼠相比,Crtap^{-/-}中与骨骼结构重叠的区域中增加的生物荧光。显示了在P10的3窝的代表性图像。在3窝中,Crtap^{-/-}小鼠显示与WT小鼠相比在头/颅盖处平均2.86倍(SD±0.34)的生物荧光信号(比例尺条=1cm)。图10E的图表显示使用TGFβ报道子细胞系,在条件培养基中评估来自在成骨条件下培养3天的WT和Crtap^{-/-}骨髓基质细胞的TGFβ活性,阐明与来自WT细胞的培养基相比更高的TGFβ活性。结果显示为WT组平均值±SD的倍数变化;每组n=5,*p<0.05。图10F是显示肺(P10)对pSmad2的免疫染色的两幅图片,其显示在WT和Crtap^{-/-}小鼠中增加的细胞内染色(40X放大率)。显示每组n=3小鼠的代表性图像(比例尺条=20μm)。

[0019] 图11是显示Crtap^{-/-}小鼠在用TGFβ中和抗体1D11处理后的表型校正的一组照片和图表。图11A是16周龄野生型(WT)、对照抗体-处理的Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠在处理8周后的L4椎体的一系列三张微型CT图像。图11B是显示L4椎体的微型CT结果的一组三张图表,其阐明WT、对照Crtap^{-/-}和1D11处理的Crtap^{-/-}小鼠中增加的骨体积/总体积(BV/TV)、小梁数目(Tb.N)和厚度(Tb.Th)。结果显示为平均±SD,n=8每组,对Crtap^{-/-}1D11vs.Crtap^{-/-}对照为*p<0.05,对Crtap^{-/-}vs.WT为+p<0.05。图11C是显示L4椎骨的组织形态测定分析结果的一组三张图表,其显示Crtap^{-/-}小鼠中与WT相比增加的每骨表面积破骨细胞(N.Oc/BS)和成骨细胞(N.Ob/BS)数目。在用1D11处理后减少的成骨细胞和破骨细胞数目表明在Crtap^{-/-}小鼠中对加速的骨重建的有效抑制。Crtap^{-/-}小鼠中增加的每骨表面积的骨细胞数目(N.Ot/B.Ar)在1D11处理后被减少至WT水平。结果显示为平均±SD,每组n=6,对Crtap^{-/-}1D11 vs.Crtap^{-/-}对照为*p<0.05,对Crtap^{-/-}vs.WT为+p<0.05。图11D是显示16周龄野生型(WT)、对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠在处理8周后膨胀的肺的苏木精/伊红染色的一系列三张图像。与WT小鼠相比,Crtap^{-/-}对照小鼠显示远端气道空间的增加。在用1D11处理后,与对照Crtap^{-/-}小鼠相比,远端气道直径存在减少。显示每组n=8小鼠的代表性图像(比例尺条=100μm)。图11E是显示通过平均线性截距法(MLI)定量的肺泡结构(alveolar structure)之间距离的图表,其阐明与对照抗体处理的Crtap^{-/-}和WT小鼠相比,1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠中远端气道空间的显著减少。结果显示为平均±SD,每组n=8只小鼠,每只小鼠分析10张图像,对Crtap^{-/-}1D11 vs.Crtap^{-/-}对照为*p<0.05,对Crtap^{-/-}vs.WT为+p<0.05。

[0020] 图12是显示与I型胶原结合的核心蛋白多糖和P9863Hyp位点重叠并且在Crtap^{-/-}小鼠的I型胶原中减少的一系列图表。图12A是显示P3小鼠颅盖骨的定量RT-PCR结果的一组三张图表,其显示与WT相比,Crtap^{-/-}小鼠颅盖骨中富含亮氨酸的小蛋白多糖类核心蛋白多糖(Dcn)、双糖链蛋白多糖(biglycan;Bgn)和asporin(Aspn)的RNA表达没有不同。结果给出为WT组平均值±SD的倍数变化,每组n=5。图12B是显示表面等离子体共振分析结果的图表,其表明重组核心蛋白多糖核心蛋白与Crtap^{-/-}小鼠的I型胶原的结合与野生型I型胶原

相比少大约45%。使用3、5和12 μ M的核心蛋白多糖进行了三个独立实验。显示了结合的核心蛋白多糖总量的响应单位,其标准化至固定于芯片上的I型胶原。结合Crtap^{-/-}I型胶原的核心蛋白多糖的平均减少为44.6 $\pm$ 7.9%。

[0021] 图13是显示对增加的TGF β 信号传导的抑制改善显性OI的小鼠模型中的骨表型的一系列图表和照片,所述OI是由于Col1a2基因中的G610C突变(Col1a2^{tm1.1Mcbr})。图13A是显示TGF β 靶基因p21和PAI-1的定量RT-PCR结果的两个图表,其表明P3WT和Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠颅盖骨中增加的TGF β 信号传导。结果显示为WT组平均值 $\pm$ SD的倍数变化;每组n=3,*p<0.05。图13B是蛋白印迹分析结果的照片,其显示与WT相比,在WT和Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠的P3颅盖中相对于总Smad2蛋白水平,活化Smad2(pSmad2)水平增加,提示增加的TGF β -信号传导;每组n=3。图13C是显示图13B所示蛋白印迹的定量的图表。结果显示为WT组平均值 $\pm$ SD的倍数变化;*p<0.05。图13D是16周龄野生型(WT)、对照抗体-处理的Col1a2^{tm1.1Mcbr}和1D11-处理的Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠在处理8周后的L4椎体的一系列微型CT图像的照片。图13E是来自L4椎体微型CT的数据的一系列图表,其显示用1D11处理后Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠中增加的骨体积/总体积(BV/TV)、小梁数目(Tb.N)和厚度(Tb.Th)。结果显示为平均 $\pm$ SD,每组n=6,对Col1a2^{tm1.1Mcbr} 1D11 vs.Col1a2^{tm1.1Mcbr}对照为*p<0.05,对Col1a2^{tm1.1Mcbr} vs.WT为+p<0.05。

[0022] 图14是重量曲线图表,其显示在研究期间与WT相比Crtap^{-/-}小鼠降低的体重(对全部时间点p<0.05,显示平均 $\pm$ SE)。1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠相比于对照Crtap^{-/-}小鼠没有观察到重量的统计学显著差异。

[0023] 图15是显示TGF β 抑制对Crtap^{-/-}小鼠中异常I型胶原翻译后修饰没有作用的一系列图和表。图15A是显示提取自WT、对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠胫骨(16周龄小鼠,在处理8周后)的I型胶原的串联质谱的一系列三张图表。上图的序列为SEQ ID NO:19,中图的序列为SEQ ID NO:20,而下图的序列为SEQ ID NO:21。图15B是显示对串联质谱分析的总结的表。1D11处理并没有显著影响骨样品中胶原残基Pro986a1(I)的3-羟基化状态。显示3-羟基化残基百分比的均值($\pm$ SD),每组n=5。图15C是一组三张图表,其显示对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠的骨I型胶原,与WT小鼠相比展现羟基赖氨酰吡啶诺林(HP)以及赖氨酰吡啶诺林交联物(LP)水平的变化和HP/LP比率的增加。与对照Crtap^{-/-}小鼠相比,Crtap^{-/-}小鼠的1D11处理并不显著影响这些参数。结果以平均 $\pm$ SD给出,每组n=4只小鼠,Crtap^{-/-} vs.WT为+p<0.05。

[0024] 图16是显示处理研究开始(图16A=8周龄)和末尾(图16B=16周龄)时血清骨更新标志物骨钙蛋白(OCN)和骨胶原C-端交联端肽(CTX)的一系列图表。图16A是显示与WT小鼠相比,在研究开始8周龄Crtap^{-/-}中增加的OCN和CTX血清水平的两张图表,表明Crtap^{-/-}小鼠中增加的骨更新。结果以平均 $\pm$ SD给出,对WT n=8,对Crtap^{-/-}小鼠n=14,对Crtap^{-/-} vs.WT为+p<0.05。图16B是两张图表,其显示与对照Crtap^{-/-}小鼠相比,16周龄的1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠显示降低的血清OCN的趋势和显著降低的CTX血清水平,表明TGF β 抑制对增加的骨更新的抑制。结果以平均 $\pm$ SD给出,对WT n=8,每Crtap^{-/-}组n=7,对Crtap^{-/-} 1D11 vs.Crtap^{-/-}对照为*p<0.05,对Crtap^{-/-} vs.WT为+p<0.05。

[0025] 图17是显示WT、对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠椎体L4(16周龄小鼠,在处理8周后)的微型CT分析结果的表。对骨体积/组织体积(BV/TV)、小梁数目(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间隙(Tb.Sp)和骨体积的骨矿物质密度(BMD BV)显示平均 $\pm$ SD;每组n=8,

+表示如果等方差检验失败的秩和Kruskal-Wallis单因素ANOVA, n.s.=统计学不显著。

[0026] 图18是显示WT、对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠近端股骨小梁骨(16周龄小鼠,在处理8周后)的微型CT分析结果的表。对骨体积/组织体积(BV/TV)、小梁数目(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间隙(Tb.Sp)和骨体积的骨矿物质密度(BMD BV)显示平均±SD; n=8每组。+表示如果等方差检验失败的秩和Kruskal-Wallis单因素ANOVA, n.s.=统计学不显著。

[0027] 图19是显示WT、对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠股骨骨干骨皮质(cortical bone at the femur midshaft)(16周龄小鼠,处理8周后)的微型CT分析结果的表。对皮质厚度、骨体积的骨矿物质密度(BMD BV)、前后(a.p.)直径、横截面面积(CSA)和对内外(medio-lateral;m.l.)和前后(a.p.)轴的横截面转动惯量(CSMI); n=8每组。n.s.=统计学不显著。

[0028] 图20是显示通过3点弯曲对股骨生物力学测试的结果的表(16周龄小鼠,处理8周后)。与WT小鼠相比,对照Crtap^{-/-}小鼠展现显著降低的生物力学参数,除了弹性模量和弹性位移之外。用1D11抗TGFβ处理导致Crtap^{-/-}股骨中最大负荷和极限强度的显著改善,表明增加的全骨和组织强度。然而,没有观察到屈服后位移的显著变化,表明1D11并不影响OI骨中增加的脆性。对WT, N=6; 对对照Crtap^{-/-}, n=4; 而对1D11处理的Crtap^{-/-}小鼠, n=3。n.s.=统计学不显著。

[0029] 图21是显示WT、对照Crtap^{-/-}和1D11-处理的Crtap^{-/-}小鼠L4椎体(16周龄小鼠,处理8周后)的组织形态测定分析结果的表。对骨体积/组织体积(BV/TV)、小梁数目(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间隔(Tb.Sp)、破骨细胞数目/骨表面积(N.Oc/BS)、破骨细胞表面积/骨表面积(Oc.S/BS)、成骨细胞数目/骨表面积(N.Ob/BS)、成骨细胞表面积/骨表面积(Oc.S/BS)和骨细胞数目/骨面积(N.Ot/B.Ar)显示平均±SD; 每组n=6。+表示如果等方差检验失败的秩和Kruskal-Wallis单因素ANOVA, n.s.=统计学不显著。

[0030] 图22是显示WT、对照Col1α2^{tml.1Mcbr}和1D11处理的Col1α2^{tml.1Mcbr}小鼠椎体L4(16周龄小鼠,处理8周后)的微型CT分析结果的表。对骨体积/组织体积(BV/TV)、小梁数目(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间隔(Tb.Sp)和骨体积的骨矿物质密度(BMD BV)显示平均±SD; n=6每组, n.s.=统计学不显著。

[0031] 图23是显示测量重组核心蛋白多糖核心蛋白与WT和Crtap^{-/-}小鼠的I型胶原结合的表面等离子体共振分析的图表。来自两个独立生物学重复(◆重复1、▲重复2)的核心蛋白多糖进行各个所指明浓度的三个技术重复。结果显示为WT平均值的百分比(短线表示每组平均值)。

[0032] 图24(显微图像)显示对WT和Crtap^{-/-}小鼠远端股骨干骺端中的核心蛋白多糖免疫染色,在20X,每基因型n=3,比例尺条=100μm(图24A-24C),以及40X放大率,每基因型n=3,比例尺条=50μm(图24D-24F)。对照股骨仅仅在二抗中孵育。

[0033] 图25(显微图像)显示对WT和Crtap^{-/-}小鼠远端股骨干骺端中的TGFβ1免疫染色,在20X,每基因型n=3,比例尺条=100μm(图25A-25C),以及40X放大率,每基因型n=3,比例尺条=50μm(图25D-25F)。对照股骨仅仅在二抗中孵育。

[0034] 图26(显微图像)显示对WT和Col1α2^{tml.1Mcbr}小鼠远端股骨干骺端中的TGFβ1免疫染色,在20X,每基因型n=3,比例尺条=100μm(图26A-26C),以及40X放大率,每基因型n=3,

比例尺条=50 μ m(图26D-26F)。对照股骨仅仅在二抗中孵育。

[0035] 发明概述

[0036] 本发明涉及用于有效地治疗成骨不全(OI)的方法。更具体地,本发明涉及使用特异性结合转化生长因子 β (TGF β)或其同种型的结合蛋白如抗体或其抗原结合片段治疗OI的方法。优选地,所述结合蛋白是“泛特异性的(pan-specific)”且结合TGF β 的全部三种人同种型,即TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。更优选地,所述结合蛋白特异性结合并中和人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。在一方面,本发明提供了用于在有需要的受试者中治疗OI的方法,包括给所述受试者施用治疗有效量的特异性结合TGF β 的抗体或其抗原结合片段。

[0037] 在一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含具有选自SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的三个互补决定区(CDR);以及轻链可变区,所述轻链可变区包含具有选自SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列的三个CDR。

[0038] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0039] 在一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段还包含人IgG4恒定区。在一实施方式中,所述人IgG4恒定区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段还包含人 κ 轻链恒定区。在另一实施方式中,所述人 κ 轻链恒定区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段还包含人IgG4恒定区,和人 κ 轻链恒定区。

[0040] 在另一实施方式中,所述人IgG4恒定区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,以及所述人 κ 轻链恒定区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0041] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段中和人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。

[0042] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段改善骨参数,所述骨参数选自骨体积密度(BV/TV)、总骨表面积(BS)、骨表面积密度(BS/BV)、小梁数目(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间隙(Tb.Sp)和总体积(Dens TV)。

[0043] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段抑制骨吸收。

[0044] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段减少骨吸收的血清标志物,所述骨吸收的血清标志物选自尿羟基脯氨酸、尿总吡啶诺林(PYD)、尿游离脱氧吡啶诺林(DPD)、尿I型胶原交联的N-端肽(NTX)、尿或血清I型胶原交联的C-端肽(CTX)、骨涎蛋白(BSP)、骨桥蛋白(OPN)和酒石酸盐抗性酸性磷酸酶5b(TRAP)。

[0045] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段增加骨沉积血清标志物,所述骨沉积血清标志物选自总碱性磷酸酶、骨特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白和I型前胶原(C-端/N-端)。

[0046] 在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段抑制骨吸收。在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段促进骨沉积。在另一实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段

改善受OI影响的非骨骼器官的功能,所述功能选自听觉功能、肺功能和肾功能。

[0047] 在另一方面,本发明提供在有需要的受试者中治疗OI的方法,包括给所述受试者施用治疗有效量的结合TGFβ的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0048] 在另一方面,本发明提供了用于在有需要的受试者中治疗OI的方法,包括给所述受试者施用治疗有效量的与至少一种治疗剂组合的结合TGFβ的抗体或其抗原结合片段。在另一实施方式中,所述治疗剂是双膦酸盐。

[0049] 发明详述

[0050] A. 定义

[0051] 除非另外定义,本文所用全部技术和科学术语具有与本领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0052] 应当指出如本文所用以及在所附权利要求中,单数形式的“一(a)”、“一(an)”、“所述(the)”包括复数指代,除非上下文另外清楚指明。

[0053] 术语“约”或“大约”指的是在给定的值或范围的10%,更优选5%(或1%或更少)以内。

[0054] 术语“施用(asminister)”或“施用(administration)”指的是将在体外存在的物质(如抗体)注射或以其他方式物理递送进患者的动作,例如,通过粘膜、真皮内、静脉内、皮下、肌肉内递送,和/或本文描述的或本领域已知的任何其它物理递送方法。当治疗疾病或其症状时,所述物质的施用一般在所述疾病或其症状出现之后进行。当预防疾病或其症状时,所述物质的施用一般在所述疾病或其症状出现前进行。

[0055] TGFβ的“拮抗剂”或“抑制剂”指的是例如在表达TGFβ的细胞中或在表达TGFβ配体或表达TGFβ受体的细胞中,能够抑制或以其他方式降低TGFβ的一或多种生物学活性的分子。在某些示例性实施方式中,本发明的抗体是拮抗剂抗体,其与细胞接触时抑制或以其他方式降低所述细胞中的TGFβ活性,所述细胞具有细胞表面表达的TGFβ受体(如,TGFβ受体1、2或3)。在一些实施方式中,TGFβ的拮抗剂(如本发明的抗体)可以例如通过抑制或以其他方式降低表达TGFβ受体的细胞的活化和/或细胞信号传导途径而起作用,由此相对于不存在所述拮抗剂的TGFβ介导的生物学活性,抑制所述细胞的TGFβ介导的生物学活性。在本发明的某些实施方式中,所述抗体TGFβ抗体是拮抗性抗TGFβ抗体,优选全人、单克隆拮抗性抗TGFβ抗体。

[0056] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文可互换使用。术语抗体包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、细胞内抗体、单链Fv(scFv)(如,包括单特异性、双特异性等)、骆驼化抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗-Id)抗体和上述任一的表位结合片段。具体而言,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即抗原结合结构域或含有特异性结合TGFβ抗原的抗原结合位点的分子(如抗TGFβ抗体的一或多个互补决定区(CDR))。所述抗TGFβ抗体可以是任何型(如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、任何类(如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(如,IgG2a和IgG2b)的免疫球蛋白分子。在某些实施方式中,所述抗TGFβ抗体是人源化的,例如人源化的单克隆抗TGFβ抗体。在其它实施方式中,所述抗TGFβ抗体是全人抗体,例如全人单克隆抗TGFβ抗体。在优选实施

方式中,所述抗TGFβ抗体是IgG抗体,例如IgG4抗体。

[0057] 术语“组合物”和“制剂”旨在涵盖含有(任选地)特定量的特定成分(如抗TGFβ抗体)的产品,以及直接或间接获得自所述(任选地)特定量的特定成分的组合的任意产品。

[0058] 术语“恒定区”或“恒定结构域”指的是轻链和重链羧基端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但展现多种效应子功能,例如和Fc受体相互作用。所述术语指的是免疫球蛋白分子的一部分,其相对于免疫球蛋白的其它部分(含有抗原结合位点的可变结构域),具有更保守的氨基酸序列。所述恒定结构域含有重链的CH1、CH2和CH3结构域,以及轻链的CHL结构域。

[0059] 术语“表位”指的是抗原(例如TGFβ多肽或TGFβ多肽片段)表面上的局部区域,其能够结合抗体的一或多个抗原结合区,且在动物、优选哺乳动物及最优选人中具有能够引起免疫应答的抗原性或免疫原性活性。具有免疫原性活性的表位是多肽在动物中引起抗体应答的部分。具有抗原性活性的表位是多肽中抗体特异性结合的部分,其通过本领域公知的任何方法确定,例如免疫测定法。抗原性表位并不一定需要是免疫原性的。表位通常由一组化学活性表面分子例如氨基酸或糖侧链组成并具有特定三维结构特性以及特定电荷特性。多肽构成表位的区域可以是所述多肽中的邻接的氨基酸或表位可以来自所述多肽两个或更多个非邻接区域。表位可以是或可以不是抗原的三维表面特征。在某些实施方式中,TGFβ表位是TGFβ多肽的三维表面特征(如,在TGFβ多肽的三聚体形式)。在其它实施方式中,TGFβ表位是TGFβ多肽的线性特征(如,以TGFβ多肽的二聚体或单体形式)。抗TGFβ抗体可以特异性结合TGFβ的单体形式的表位,TGFβ二聚体形式的表位,或TGFβ的单体形式或二聚体形式两者。

[0060] 术语“赋形剂”指的是通常用于药物作为稀释剂、媒介物、防腐剂、结合剂、稳定剂等的情性物质,且包括但不限于,蛋白质(如血清白蛋白等)、氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、组氨酸等)、脂肪酸和磷脂类(如烷基磺酸盐类、辛酸盐等)、表面活性剂(如SDS、聚山梨酯、非离子型表面活性剂等)、糖类(如蔗糖、甘露糖、海藻糖等)和多元醇(如甘露醇、山梨醇等)。也见Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa., 其通过引用整体并入本文。

[0061] 在肽和多肽的上下文中,术语“片段”指的是包含少于全长氨基酸序列的肽或多肽。此类片段可以获得自例如所述氨基酸序列氨基端处的截短、羧基端处的截短和/或内部残基缺失。片段可以例如获得自选择性RNA剪接或获得自体内蛋白酶活性。在某些实施方式中,TGFβ片段包括这样的多肽,所述多肽包含TGFβ多肽氨基酸序列的至少50个,至少100个氨基酸残基,至少125个邻接的氨基酸残基,至少150个邻接的氨基酸残基,至少175个邻接的氨基酸残基,至少200个邻接的氨基酸残基或至少250个邻接的氨基酸残基的氨基酸序列。在一具体实施方式中,TGFβ多肽或特异性结合TGFβ抗原的抗体的片段保留全长多肽或抗体的至少1种,至少2种或至少3种功能。

[0062] 术语“全人抗体”或“人抗体”在本文可互换使用且指的是包含人可变区和最优选人恒定区的抗体。在具体实施方式中,所述术语指的是包含人来源的可变区和恒定区的抗体。“全人”抗TGFβ抗体,在某些实施方式中,也可以涵盖结合TGFβ多肽且由人种系免疫球蛋白核酸序列的天然出现的体细胞变体的核酸序列编码的抗体。在具体实施方式中,抗TGFβ抗体是全人抗体。术语“全人抗体”包括具有对应于Kabat等(See Kabat等(1991))

Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 所描述的人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。产生全人抗体的方法是本领域已知的。

[0063] 短句“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的人抗体,例如使用转染至宿主细胞的重组表达载体表达的抗体,分离自重组的组合人抗体文库的抗体,分离自对人免疫球蛋白基因是转基因的或转染色体的动物(如小鼠或牛)的抗体(见例如, Taylor, L.D. 等 (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), 或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其它手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体可以具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(见 Kabat, E.A. 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。然而,在某些实施方式中,此类重组人抗体被进行体外诱变(或当使用人Ig序列的转基因动物时,体内体细胞诱变),且因此所述重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列当衍生自或与人种系VH和VL序列相关时,可以并不天然体内存在于人抗体种系库。

[0064] 术语“重链”在提及抗体使用时,指的是基于重链恒定结构域氨基酸序列的5种不同型,称作阿尔法(α)、德尔塔(Δ)、伊普西隆(ϵ)、伽马(γ)和缪(μ)。重链的这些不同型是本领域公知的且给出5种不同类的抗体,分别是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括IgG的4个亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。优选地所述重链是人重链。

[0065] “分离的”或“纯化的”抗体基本上没有细胞物质或其它来自所述抗体所获得自的细胞或组织来源的污染蛋白,或当化学合成时基本上没有化学前体或其它化合物。语句“基本上没有细胞物质”包括抗体制备物,其中所述抗体与细胞的细胞组分分开,所述抗体从所述细胞分离或重组产生。因此,基本上没有细胞物质的抗体包括抗体制备物,其具有少于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的异源蛋白(在本文也称作“污染蛋白”)。当所述抗体重组产生时,其也优选地基本上没有培养基,即培养基占蛋白制备物的体积少于约20%、10%或5%。当所述抗体通过化学合成产生时,其优选基本上没有化学前体或其它化合物,即,其参与蛋白合成的化学前体或其它化合物分开。因此,抗体的此类制备物具有少于约30%、20%、10%、5%(以干重计)的除感兴趣抗体外的化学前体或化合物。在优选实施方式中,抗TGF β 抗体是分离的或纯化的。

[0066] 术语“Kabat编号”及类似术语是本领域承认的且指的是对抗体或其抗原结合片段的重链和轻链可变区中比其它氨基酸残基更可变(即超变)的氨基酸进行编号的系统(Kabat等(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 and, Kabat 等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。对于重链可变区,超变区一般从氨基酸位置31至35的范围为CDR1,氨基酸位置50至65为CDR2,而氨基酸位置95至102为CDR3。对于轻链可变区,超变区一般从氨基酸位置24至34的范围为CDR1,氨基酸位置50至56为CDR2,而氨基酸位置89至97为CDR3。

[0067] 术语“轻链”在提及抗体使用时,指的是基于恒定结构域氨基酸序列的2种不同型,称作卡帕(κ)或拉姆达(λ)。轻链氨基酸序列是本领域公知的。在优选实施方式中,轻链是人轻链。

[0068] 术语“控制(manage)”、“控制(managing)”和“控制(management)”指的是受试者得自疗法(如,预防或治疗剂)的有益效果,其并不导致疾病或病症的治愈。在某些实施方式中,给受试者施用一或多种疗法(如预防或治疗剂)以“控制”TGF β 介导的疾病(如OI)或其一或多种症状,从而预防所述疾病的进展或恶化。

[0069] 术语“单克隆抗体”指的是获得自同质的或基本上同质的抗体群体的抗体,且各单克隆抗体将通常识别抗原上的单一表位。在优选实施方式中,“单克隆抗体”是由单一杂交瘤或其它细胞产生的抗体。术语“单克隆”并不限于用于制备所述抗体的任何具体方法。例如,单克隆抗体可以通过Kohler等;Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备或可以从噬菌体文库分离。其它用于制备克隆细胞系及由此制备表达的单克隆抗体的方法是本领域公知的(见例如,Chapter 11 in:Short Protocols in Molecular Biology,(2002)5th Ed.;Ausubel等,eds.,John Wiley and Sons,New York)。

[0070] 术语“药理学可接受的”指的是被联邦或州政府的管理机构批准,或在美国药典、欧洲药典或其它广泛承认的药典中列出,用于在动物中及更具体地在人中的使用。

[0071] 术语“药理学可接受的赋形剂”指的是和活性分子如单克隆抗体组合以制备合适的或便利的剂型的任何惰性物质。“药理学可接受的赋形剂”是在所采用的剂量和浓度对受体非毒性的赋形剂,且与包含所述单克隆抗体的制剂的其它成分相容。

[0072] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”指的是TGF β 介导的疾病和/或其涉及症状的发展、复发、出现或扩散的总的或部分抑制,其获得自本文提供的疗法或疗法组合(如预防或治疗剂的组合)的施用。

[0073] 术语“TGF β 抗原”指的是TGF β 多肽被抗体特异性结合的部分。TGF β 抗原还指的是TGF β 或其片段被抗体特异性结合的类似物或衍生物。在一些实施方式中,TGF β 抗原是单体TGF β 抗原或二聚体TGF β 抗原。TGF β 多肽构成表位的区域可以是所述多肽中的邻接的氨基酸或表位可以来自所述多肽两个或更多个非邻接区域。表位可以是或可以不是抗原的三维表面特征。TGF β 抗原表面上能够引起免疫应答的局部区域是TGF β 表位。表位可以是或可以不是抗原的三维表面特征。如本文所用,TGF β 抗原的“类似物”指的是和本文所述的TGF β 多肽、TGF β 多肽片段或TGF β 表位具有类似或相同功能的多肽。例如,所述类似物可以包含与本文所述TGF β 多肽(如SEQ ID NO:1、2或3)、TGF β 多肽片段、TGF β 表位或抗TGF β 抗体的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同的序列。额外地或可选地,所述多肽由在严格条件下与编码本文所述的TGF β 多肽、TGF β 多肽片段或TGF β 表位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码。

[0074] 术语“人TGF β ”、“hTGF β ”或“hTGF β 多肽”和类似术语指的是包含氨基酸序列SEQ ID NO:1、2或3的多肽和相关多肽(本文“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换使用),包括其SNP变体。相关多肽包括等位基因变体(如“SNP”变体);剪接变体;片段;衍生物;取代、缺失和插入变体;融合多肽;和种间同源物,优选地,其保留TGF β 活性和/或足以产生抗TGF β 免疫应答。还涵盖的是TGF β 的可溶形式,其足以产生抗TGF β 免疫学应答。如本领域技术人员将理解,抗TGF β 抗体能够结合TGF β 多肽、多肽片段、抗原和/或表位,由于表位是更大的抗原的一部分,所述抗原是更大的多肽片段的一部分,所述多肽片段进而是更大的多肽的一部分。hTGF β 可以以二聚体或单体形式存在。

[0075] 术语“TGF β 介导的疾病”和“TGF β 介导的病症”可互换使用且指的是完全或部分由

TGFβ如hTGFβ引起或是TGFβ如hTGFβ的结果的任何疾病或病症。在某些实施方式中，TGFβ异常表达。在一些实施方式中，TGFβ在特定细胞类型中可以异常地被上调。在其它实施方式中，TGFβ和TGFβ受体的结合引起正常、异常或过度的细胞信号传导。在某些实施方式中，TGFβ受体(如TGFβ受体1、2或3)表达于细胞表面上，所述细胞例如成骨细胞、破骨细胞或骨髓基质细胞。在某些实施方式中，所述TGFβ介导的疾病是退行性骨病，例如成骨不全。

[0076] 术语“特异性结合(binds)”或“特异性结合(binding)”意指特异性结合抗原或其片段(如TGFβ)而不特异性结合其它抗原。特异性结合抗原的抗体可以以较低亲和力结合其他肽或多肽，所述亲和力通过例如放射性免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、BIAcore或本领域已知的其它测定来确定。在某些实施方式中，本发明的抗TGFβ抗体可以以比不同的、非TGFβ抗原高多于两倍的亲和力特异性结合TGFβ(如hTGFβ)。特异性结合抗原的抗体或其变体或片段可以与相关抗原具有交叉反应性。例如，在某些实施方式中，抗TGFβ抗体可以与hTGFβ及另一TGFβ抗原(如啮齿类或非人灵长类TGFβ抗体)交叉反应。优选地，特异性结合抗原的抗体或其变体或片段不和其它非TGFβ抗原交叉反应。特异性结合TGFβ抗原的抗体或其变体或片段可以通过例如免疫测定、BIAcore或本领域技术人员已知的其它技术鉴别。典型地，特异性或选择性反应将是背景信号或噪音的至少两倍，且更典型地，超过背景10倍。在一些实施方式中，结合蛋白或抗体将以 1×10^{-6} M至 1×10^{-7} M的解离常数结合其抗原，如TGFβ。在其它实施方式中，所述解离常数为 1×10^{-6} M至 1×10^{-8} M。关于抗体特异性的讨论见例如Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York, 第332-336页。

[0077] 术语“受试者”和“患者”可互换使用。如本文所用，受试者优选是哺乳动物，例如非灵长类(如牛、猪、马、猫、犬、大鼠等)和灵长类(如猴和人)，最优选人。在一实施方式中，所述受试者是患有TGFβ介导的疾病的哺乳动物，优选人。在另一实施方式中，所述受试者是具有发展出TGFβ介导的疾病的风险的哺乳动物，优选人。

[0078] 术语“治疗剂”指的是能够用于治疗、控制或缓解TGFβ介导的疾病和/或其相关症状的任何药剂。在某些实施方式中，术语“治疗剂”指的是TGFβ抗体。在某些其它实施方式中，术语“治疗剂”指的是除TGFβ抗体外的药剂。优选地，治疗剂是已知可用于或已经用于或当前正用于治疗、控制或缓解TGFβ介导的疾病或一或多种其相关症状的药剂。

[0079] 术语“疗法”指的是能够用于预防、控制、治疗和/或缓解TGFβ介导的疾病(如OI)的任何方案、方法和/或药剂。在某些实施方式中，术语“疗法(therapies)”和“疗法(therapy)”指的是本领域技术人员(如医务人员)已知的可用于预防、控制、治疗和/或缓解TGFβ介导的疾病的生物疗法、支持疗法和/或其它疗法。

[0080] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”指的是TGFβ介导的疾病(如OI)的进展、严重性和/或持续时间的减少或缓解，其获得自一或多种疗法的施用(包括但不限于一或多种预防或治疗剂的施用)。在具体实施方式中，此类术语指的是TGFβ与TGFβ受体结合的减少或抑制，受试者中表达TGFβ受体的细胞中TGFβ的产生或分泌的减少或抑制，受试者中不表达TGFβ受体的细胞中TGFβ的产生和分泌的减少或抑制，和/或与TGFβ介导的疾病例如OI相关的一或多种症状的抑制或减少。

[0081] 术语“可变区”或“可变结构域”指的是轻链和重链的一部分，一般在重链中大约氨基端120-130个氨基酸和在轻链中大约100-110个氨基酸，其在抗体之间在序列上广泛地不

同并且用于各具体抗体对其具体抗原的结合和特异性。序列中的可变性集中于称作互补决定区 (CDR) 的那些区域,而在可变结构域中较高度保守的区域称作框架区 (FR)。轻链和重链的 CDR 主要负责抗体和抗原的相互作用。氨基酸位置编号根据 EU Index, 如 Kabat 等 (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington D.C.) 5th ed. (“Kabat 等”)。在优选实施方式中,所述可变区是人可变区。

[0082] B. 成骨不全 (OI)

[0083] OI 涵盖一组先天性骨疾病,特征为一或多种参与骨基质沉积或稳态平衡的蛋白的缺陷。有 8 种类型的 OI,其通过它们的特定基因突变,和所造成的蛋白缺陷以及受影响个体的表型来定义。尽管 OI 类型之间的表型不同,共同的症状包括骨和牙的不完全骨化、减少的骨量、脆骨和病理性骨折。

[0084] I 型胶原是钙化和非钙化组织中最丰富的结缔组织蛋白之一。I 型胶原的精确合成、翻译后修饰和分泌对于正确的组织发育、维持和修复是必需的。患有 OI 的个体中鉴别的大多数突变导致减少的 I 型胶原合成,或 I 型胶原不正确的合成和/或加工。

[0085] 除了 I 型胶原基因的突变外,在受 OI 影响的个体中已经鉴别到参与胶原细胞内运输和加工的基因中的其它突变。这些基因包括分子伴侣,例如 FK506 结合蛋白 10 (FKBP10) 和热休克蛋白 47 (HSP47) (Alanay 等, 2010; Christiansen 等, 2010; Kelley 等, 2011)。在分子间胶原交联基因如前胶原-赖氨酸、2-酮戊二酸 5-双加氧酶 2 (PLOD2) 中,以及在胶原脯氨酰羟化酶家族基因成员包括富含亮氨酸脯氨酸的蛋白多糖 (leprecan) (LEPRE1)、肽基脯氨酰异构酶 B (亲环素 B) (CYPB) 和软骨相关蛋白 (CRTAP) (Morello 等, 2006; Cabral 等, 2007; Baldrige 等, 2008; van Dijk 等, 2009; Choi 等, 2009; Barnes 等, 2010; Pyott 等, 2011) 中鉴别到额外的突变。除了突变外,蛋白例如骨形态生成蛋白 (BMP) 和转化生长因子 β (TGF β) 和它们各自的受体被认为参与多种 OI 表型,不过它们作用的确切机理未知 (Gebken 等, 2000)。

[0086] 在一实施方式中, TGF β 表达受结合 I 型和 II 型胶原的分子调控。在某些实施方式中,富含亮氨酸的小蛋白多糖 (small leucine rich proteoglycan; SLRP) 调控 TGF β 表达。在具体实施方式中,核心蛋白多糖调控 TGF β 合成。在某些实施方式中,核心蛋白多糖并不结合 I 型或 II 型胶原,其中所述 I 型和/或 II 型胶原分子在位置 986 处不存在 3-羟脯氨酸位点。

[0087] C. 骨生物学

[0088] 脊椎动物骨骼由骨组成,其是活的、钙化的组织,其提供结构、支持、保护和用于调节离子运输的矿物来源。骨是特化的结缔组织,其包含细胞组分和无细胞组分两者。无细胞细胞外基质 (ECM) 含有胶原性蛋白和非胶原性蛋白两者,其均参与钙化过程。正确分泌和排列的 ECM 对于正确骨形成是关键。当 ECM 蛋白的任一不存在、畸形或错误排列时,导致病变,如在成骨不全中所证明的。

[0089] 术语“骨皮质”或“骨密质”指的是骨的外层,其致密、刚性且坚硬。术语“小梁骨”或“骨松质”是骨的海绵状内层,其比骨皮质轻且较不致密。术语“小梁”指的是海绵状骨的显微结构单元,其具有杆样形状和胶原性组成。

[0090] 骨是动态组织,其经受持续的重建。术语“成骨细胞”指的是沉积类骨质的终末分化的骨形成细胞。术语“类骨质”指的是未成熟的、未矿化的骨,其主要包含 I 型胶原。术语“前成骨细胞”指的是增殖中的未成熟成骨细胞,其没有完全分化。术语“骨祖细胞

(osteoprogenitor)”指的是多能细胞,其产生包括成骨细胞在内的若干基质细胞类型。骨祖细胞,通常称作“间充质干细胞”,在骨髓中产生并且能够在循环血液中分离到少量。术语“破骨细胞”指的是终末分化的骨吸收细胞,其传自骨髓单核细胞。通过其酒石酸盐抗性酸性磷酸酶 (TRAP) 的表达可以鉴别破骨细胞。

[0091] 在正常稳态平衡条件下,成骨细胞和破骨细胞协调工作以维持骨完整性。当骨沉积和骨吸收不配合时导致病变。例如,骨硬化症是特征为过度致密、坚硬的骨的骨疾病,其是破骨细胞不吸收的结果,而骨质疏松症是特征为脆的、多孔骨的骨疾病,其可由增加的破骨细胞活性造成。证据表明破骨细胞活性在成骨不全中可被增加,提示这些细胞类型为潜在的治疗介入的靶。本公开包括用TGF β 抗体抑制破骨细胞的方法。

[0092] 可使用若干方法测量和表征骨的结构、密度和质量,包括组织学和组织形态测定、原子力显微检查、共聚焦拉曼显微检查、纳米压痕 (nanoindentation)、三点弯曲测试、X射线成像和微计算机断层扫描 (μ -CT)。在示例性实施方式中,骨通过这些方法中的至少一种测量和表征。

[0093] 术语“骨体积密度”指的是骨给定体积 (总体积或TV) 中包含钙化物质 (骨体积或BV) 的分数。因此,骨体积密度计算为BV/TV并以百分比报告。术语“比骨表面积”指的是每给定骨体积的总骨表面积 (BS)。因此,比骨表面积计算为BS/TV。其它常见骨量度包括:骨面积 (B.Ar), 小梁数目 (Tb.N); 小梁间隙 (Tb.Sp); N.Oc (破骨细胞数目); Oc.S (破骨细胞表面积); Oc.S/BS; 成骨细胞数目 (N.Ob), 成骨细胞表面积 (Ob.S), 成骨细胞周长 (Ob.Pm), 和任意所述量度的衍生物。较大的Oc.S/BS是破骨细胞增加的骨吸收的指示。

[0094] D. 转化生长因子 β (TGF β)

[0095] TGF β 是多功能细胞因子,其参与细胞增殖和分化、胚胎发育、细胞基质形成、骨发育、伤口愈合、血细胞生成和免疫及炎症应答 (Roberts等,1981;Border等,1995a)。分泌的TGF β 蛋白被切割成潜伏相关肽 (LAP) 和成熟TGF β 肽,且以潜伏和活性形式被发现。成熟TGF β 肽形成同二聚体以及和其它TGF β 家族成员的异二聚体。TGF β 可以从任何天然来源纯化,或可以合成产生 (如通过使用重组DNA技术)。优选地,所述TGF β 分子来自人,在本文称作“hTGF β ”。

[0096] 有三种人TGF β 同种型:TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3 (Swiss Prot登录号分别是P01137、P08112和P10600),在它们的生物学活性状态是25kDa的同二聚体,包含由链间二硫桥连接的两个112个氨基酸的单体。TGF β 1与TGF β 2的不同在于27个主要为保守的氨基酸变化,与TGF β 3的主要在于22个主要为保守的氨基酸变化。这些差异已经定位于通过X-射线晶体学确定的TGF β 的3D结构上 (Schlunegger等,1992;Peer等,1996) 并且已经确定受体结合区域 (Griffith等,1996;Qian等,1996)。

[0097] hTGF β 1 (SEQ ID NO:1)

[0098]

MPPSGLRLLL LLLPLLWLLV LTPGRPAAGL STCKTIDMEL VKRKRIEAI RGQILSKLRLA 60
SPPSQGEVPP GPLPEAVLAL YNSTRDRVAG ESAEPEPEPE ADYYAKEVTR VLMVETHNEI 120
YDKFKQSTHS IYMFNTSEL REAVPEPVLL SRAELRLLRL KLVQEHVEL YQKYSNNSWR 180
YLSNRL LAPSDSPEWLSFDV TGVVRQWLSR GGEIEGFRLS AHCSCDSRDN TLQVDINGFT 240
TGRRGDLATI HGMNRPFLLL MATPLERAQH LQSSRHRRAL DTNYCFSSTE KNCCVRQLYI 300
DFRKDLGWKW IHEPKGYHAN FCLGPCPYIW SLDTQYSKVL ALYNQHNPQA SAAPCCVPQA 360
LEPLPIVYV GRKPKVEQLS NMIVRSCKCS 390 (SEQ ID NO:1)

[0099] hTGFβ2 (SEQ ID NO:2)

[0100]

MHYCVLSAFL ILHLVTVALS LSTCSTLDM QFMRKRIEAI RGQILSKLKL TSPPEPEPE 60
EEVPPEVISI YNSTRDLLQE KASRRAAACE RERSDEEYKA KEVYKIDMPP FFPSENAIPP 120

[0101]

TFYRPFYRIV RFDVSAMEKN ASNLVKAEFR VFRLQNPKE VPEQRIELYQ ILKSKDLTSP 180
TQRYIDSKVV KTRAEGEWLS FDVTDVHEW LHHKDRNLGF KISLHCPCT FVPSNNYIIP 240
NKSEELARF AGIDGTSTYT SGDQKTIKST RKKNSGKTPH LLLMLLPSYR LESQQTNRRK 300
KRALDAAYCF RNVQDNCLL RLYIDFKRDL GWKWIHEPKG YNANFCAGAC PYLWSSDTQH 360
SRVLSLYNTI NPEASASPCC VSQDLEPLTI LYYIGKTPKI EQLSNMIVKS CKCS 414 (SEQ ID NO:2)

[0102] hTGFβ3 (SEQ ID NO:3)

[0103]

MKMLHQRALV VLALLNFATV SLSLSTCTTL DFGHIKKRV EAIRGQILSK LRLTSPPEPT 60
VMTHVPYQVL ALYNSTRELL EEMHGEREEG CTQENTSEY YAKEIHKFDM IQGLAEHNEI 120
AVCPKGITSK VFRFNVSSVE KNRTNLFRAE FRVLRVPNPS SKRNEQRIEL FQILRPDEHI 180
AKQRYIGGKN LPTRGTAEWL SFDVTDVRE WLLRRESNLG LEISIHCPCH TFQPNGDILE 240
NIHEVMEIKF KGVDNEDDHG RGDGLRLKKQ KDHHNPHLIL MMIPPHRLDN PGQGGQRKKR 300
ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW KWHPEPKGY ANFCSGPCPY LRSADTTHST 360
VLGLYNTLNP EASASPCCVP QDLEPLTILY YVGRTPKVEQ LSNMVVKSCS CS 412 (SEQ ID NO:3)

[0104] 在人中有三种TGFβ受体,TGFβ受体1、2和3,其能够通过它们的结构和功能特性,包括对TGFβ蛋白家族成员的亲和力来区分。TGFβ蛋白与同二聚体或异二聚体TGFβ跨膜受体复合物的结合活化由胞内SMAD蛋白介导的常规TGFβ信号传导途径。

[0105] TGFβ的去调节导致病理学过程,其在人中已经牵涉多种病症,例如出生缺陷、癌症、慢性炎症、自身免疫疾病和纤维变性疾病(Border等,1994;Border等,1995b)。

[0106] 人TGFβ非常类似于小鼠TGFβ:人TGFβ1与小鼠TGFβ1仅具有1个氨基酸差异;人TGFβ2与小鼠TGFβ2仅具有3个氨基酸差异;而人TGFβ3与小鼠TGFβ3相同。

[0107] E. 结合转化生长因子 β (TGF β) 的分子

[0108] 本发明包括这样的方法,所述方法包括给受试者施用结合TGF β 的分子。TGF β 结合物可以是任意结合分子,例如抗体、融合蛋白(如免疫粘附素)、siRNA、核酸、适体、蛋白或小分子有机化合物。

[0109] 在某些实施方式中,本发明包括结合TGF β 的抗体(抗TGF β 抗体),或其变体,或其抗原结合片段。抗TGF β 抗体特异性结合TGF β 蛋白、多肽或表位。结合TGF β 的分子可以来自任何物种。

[0110] 在某些示例性实施方式中,所述结合TGF β 的抗体是人源化抗体、全人抗体或其变体,或其抗原结合片段。优选的抗TGF β 抗体阻止TGF β 和其受体的结合并抑制TGF β 生物学活性(例如TGF β 受体介导的胞内SMAD信号转导和由此产生的细胞活性)。

[0111] 在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是乐德木单抗(Lerdelimumab) (CAT-152)、美替木单抗(Metelimumab) (CAT-192)、夫苏木单抗(Fresolimumab) (GC-1008)、LY2382770、STX-100或IMC-TR1。

[0112] 在某些具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含以下互补决定区(CDR)任意一或多个的氨基酸序列:

[0113] HCDR1-SNVIS (SEQ ID NO:4);

[0114] HCDR2-GVIPIVDIANYAQRFGK (SEQ ID NO:5);或

[0115] HCDR3-TLGLVLDAMDY (SEQ ID NO:6)。

[0116] 在其它具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含以下互补决定区(CDR)任意一或多个的氨基酸序列:

[0117] LCDR1-RASQSLGSSYLA (SEQ ID NO:7);

[0118] LCDR2-GASSRAP (SEQ ID NO:8);或

[0119] LCDR3-QQYADSPIT (SEQ ID NO:9)。

[0120] 在一具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列。

[0121] 在另一具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列。

[0122] 在更具体的实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列。

[0123] 在一具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列:

[0124]

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG
VIPIVDIANY AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL
GLVLDAMDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)。

[0125] 在另一具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列:

[0126]

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRAPGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG
QGTRLEIK (SEQ ID NO: 11)。

[0127] 在更具体的实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0128] 在一些实施方式中,所述结合TGF β 的抗体还包含恒定区,如人IgG恒定区。在一些实施方式中,所述恒定区是人IgG4恒定区。在另外的实施方式中,所述恒定区是修饰的人IgG4恒定区。优选地,所述IgG4恒定区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列:

[0129]

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 12)。

[0130] 在其它实施方式中,所述恒定区是人C κ 恒定区。优选地,所述C κ 恒定区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列:

[0131]

RTVAAPSIFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLISKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO: 13)。

[0132] 在一具体实施方式中,所述结合TGF β 的抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列:

[0133]

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG
VIPIVDIANY AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL
GLVLDAMDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT
YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT

[0134]

LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ
ID NO: 14)。

[0135] 位置1-120:所述重链的可变区(VH)。下划线的是CDR(互补决定区,根据Kabat定义)。

[0136] 位置121-447:人IgG4恒定区(SwissProt IGHG4_HUMAN)。

[0137] 在其它具体实施方式中,所述结合TGFβ的抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列:

[0138]

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRAPGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG
QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ
GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 15)。

[0139] 位置1-108:所述轻链的可变区(VL)。下划线的是CDR(互补决定区,根据Kabat定义)。

[0140] 位置109-215:人Cκ恒定区。

[0141] 在另外的实施方式中,所述结合TGFβ的抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0142] 在一些实施方式中,所述结合TGFβ的抗体由宿主细胞表达为包含前导序列。所述前导序列优选包含长1-30个氨基酸,更优选25-25个氨基酸,以及最优选19个氨基酸的氨基酸序列。所述重链、轻链或重链和轻链两者可以包含前导序列。

[0143] 例如,所述轻链或重链前导序列可以包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列:MGWSCIILFL VATATGVHS (SEQ ID NO:16)。因此,宿主细胞可以表达未加工的重链,所述未加工的重链可包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列:

[0144]

MGWSCIILFL VATATGVHSQ VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGYTFSS 50
NVISWVRQAP GQGLEWMGGV IPIVDIANYA QRFKGRVTIT ADESTSTTYM 100
ELSSLRSEDV AVYYCASTLG LVLDAMDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL 150

[0145]

APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG 200
LYSLSSVVTV PSSSLGKTY TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPSCPA 250
PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG 300
VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVS VLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKGLPSS 350
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW 400
ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA 450
LHNHYTQKSL SLSLGK 466 (SEQ ID NO: 17)。

[0146] 其中

[0147] 位置1-19:前导序列

[0148] 位置20-139:所述重链的可变区(VH)。下划线的是CDR(互补决定区,根据Kabat定义)。

[0149] 位置140-466:人IgG4恒定区(SwissProt IGHG4_HUMAN)。

[0150] 在其它示例性实施方式中,表达未加工轻链的宿主细胞可包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列:

[0151]

MGWSCIILFL VATATGVHSE TVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSLGS 50
SYLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASSRAPGIPD RFSGSGSGTD FTLTISRLEP 100
EDFAVYYCQQ YADSPITFGQ GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA 150
SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 200
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN 234 (SEQ ID NO: 18)。

[0152] 其中

[0153] 位置1-19:前导序列

[0154] 位置20-127:所述轻链的可变区(VL)。下划线的是CDR(互补决定区,根据Kabat定义)。

[0155] 位置128-234:人C_κ的恒定区。

[0156] 在本发明的示例性实施方式中,所述结合TGFβ的抗体是人源化抗体或全人抗体。人源化抗体和全人抗体同种型的实例包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。优选地,所述抗TGFβ抗体是IgG抗体。有四种形式的IgG。优选地,所述抗TGFβ抗体是IgG4抗体。在本发明的一个实施方式中,所述抗TGFβ抗体是人源化的IgG4抗体。在本发明的另一实施方式中,所述抗TGFβ抗体是全人IgG4抗体。

[0157] 在本发明最优选的实施方式中,所述抗TGFβ抗体是IgG4抗TGFβ抗体,其包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在本发明可选的最优选的实施方式中,所述抗TGFβ抗体是IgG4抗TGFβ抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4、5和6的3个互补决定区,且所述轻链可变区包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:7、8和9的3个CDR。美国专

利No.7,723,486和美国专利No.8,383,780中详细描述了抗TGF β 抗体的鉴别、分离、制备和表征,包括这样的抗TGF β 抗体,其包含含有SEQ ID NO:14的重链氨基酸序列,和含有SEQ ID NO:15的轻链氨基酸序列,且CDR序列对应于SEQ ID NO:4-9,所述专利通过引用整体并入本文。

[0158] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是“泛特异性的”并且结合人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。更优选地,所述抗体或其抗原结合片段结合人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3,并作为拮抗剂起作用。更优选地,所述抗体或其抗原结合片段结合人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3,并中和人TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3。适于本发明的方法中使用的示例性泛特异性抗TGF β 单克隆抗体(mAb)描述于美国专利Nos.7,723,476和8,383,780,其各自通过引用整体并入本文。

[0159] 1D11.16是示例性鼠泛特异性抗TGF β 抗体,其在大量体外测定中中和人和小鼠TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3(Dasch等,1989;Dasch等,1996;R&D System对MAB1835的产品说明,其各自通过引用整体并入本文),并且在纤维化动物模型中的概念验证研究中是有效的(Ling等,2003;Miyajima等,2000;Schneider等,1999;Khanna等,1999;Shenkar等,1994)。然而,由于1D11.16是鼠单克隆抗体(Dasch等,1989;Dasch等,1996),其对于在人中的治疗用途不是优选的。因此,在某些实施方式中,在本发明的方法中采用1D11.16抗体的变体或衍生物。

[0160] 如上所述,本发明的某些实施方式还包括抗TGF β 抗体的变体或衍生物。具体而言,本发明可包括抗TGF β 抗体的变体,所述抗TGF β 抗体是IgG4抗TGF β 抗体,其包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在其它实施方式中,本发明包括1D11.16抗体的变体或衍生物。抗TGF β 抗体的变体基于它们的高相似性,可以具有类似的物理化学性质,并因此也包括在本发明的范围内。变体定义为具有与本文描述的抗TGF β 抗体至少80%、至少90%、至少95%或至少97%如至少98%或99%同源的氨基酸序列,并能够竞争与TGF β 多肽、TGF β 多肽片段或TGF β 表位的结合的抗体。优选地,所述变体将改善、中和/或以其他方式抑制TGF β 和其受体的结合以及TGF β 生物学活性(例如TGF β 受体介导的胞内SMAD信号转导和由此产生的细胞活性)。与靶结合的竞争的测定可以通过本领域技术人员已知的常规方法实现。优选地所述变体是人抗体,优选是IgG4分子。在优选的实施方式中,所述变体在氨基酸序列上与IgG4抗TGF β 抗体具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同性,所述IgG4抗TGF β 抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。术语“变体”指的是包含这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列相比于所述抗TGF β 抗体的氨基酸序列有一或多个氨基酸改变。所述变体可以具有保守性序列修饰,包括氨基酸取代、修饰、添加和缺失。

[0161] 修饰的实例包括但不限于,糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知保护基/封闭剂的衍生化、蛋白水解切割,以及连接至细胞配体或其它蛋白。可以通过本领域已知的标准技术导入氨基酸修饰,例如在编码所述抗体的核酸中的定点诱变、分子克隆、寡核苷酸定向诱变和随机PCR介导的诱变。保守性氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似结构或化学特性的氨基酸残基替换的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸),具有不带电极性侧链的氨基酸(如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、丙氨

酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸),以及具有芳香族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)。本领域技术人员也将清楚也可以采用除上述所用的之外的氨基酸残基家族分类。此外,变体可以具有非保守性氨基酸取代,例如用具有不同结构或化学特性的氨基酸残基置换氨基酸。类似的次要变化还可以包括氨基酸缺失或插入或两者。确定哪些氨基酸残基可以被取代、修饰、插入或缺失而不破坏免疫学活性的指导可以使用本领域公知的计算机程序找到。本领域技术人员已知的计算机算法,例如尤其是Gap或Bestfit,可以用于最优地比对待比较的氨基酸序列并定义相似的或相同的氨基酸残基。与抗TGF β 抗体相比,变体可以具有相同的或不同的,更高的或较低的结合亲和力,但仍然能够特异性结合TGF β ,且可以和所述抗TGF β 抗体具有相同的、更高的或更低的生物学活性。

[0162] 本发明的实施方式还包括所述抗TGF β 抗体的抗原结合片段。术语“抗原结合结构域”、“抗原结合区”、“抗原结合片段”和类似术语指的是抗体的一部分,其包含与抗原相互作用并赋予所述结合剂对抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基(如互补决定区(CDR))。所述抗原结合片段可以衍生自任何动物物种,例如啮齿类(如兔、大鼠或仓鼠)和人。优选地,所述抗原结合片段将具有人来源。抗原结合片段的非限制性实例包括:Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)分子、dAb片段和由模拟所述抗体超变区的氨基酸残基组成的最小识别单元。

[0163] F. 治疗性施用

[0164] 本文描述的方法包括给受试者施用治疗有效量的结合TGF β 的抗体。如本文所用,短句“治疗有效量”指的是结合TGF β 的抗体的剂量,其导致与OI相关的一或多种症状的可检测的改善,或其引起与导致成骨不全的病症或症状的病理学机制相关的生物学效应(如降低特定生物标志物的水平)。例如,结合TGF β 的抗体增加骨矿物质密度、增加骨量和/或骨强度、减少骨折和/或牙折断和/或改善OI的任何诊断性量度的剂量被认为是治疗有效量。

[0165] 在一实施方式中,在用结合TGF β 的抗体治疗后,骨矿物质密度、骨量和/或骨强度增加大约5%至大约200%。在某些实施方案中,在用结合TGF β 的抗体治疗后,骨矿物质密度、骨量和/或骨强度增加大约5%至大约10%、10%至大约15%、15%至大约20%、20%至大约25%、25%至大约30%、30%至大约35%、35%至大约40%、40%至大约45%、45%至大约50%、50%至大约55%、55%至大约60%、60%至大约65%、65%至大约70%、70%至大约75%、75%至大约80%、80%至大约85%、85%至大约90%、90%至大约95%、95%至大约100%、100%至大约105%、105%至大约110%、110%至大约115%、115%至大约120%、120%至大约125%、125%至大约130%、130%至大约135%、135%至大约140%、140%至大约145%、145%至大约150%、150%至大约155%、155%至大约160%、160%至大约165%、165%至大约170%、170%至大约175%、175%至大约180%、180%至大约185%、185%至大约190%、190%至大约195%或195%至大约200%。

[0166] 在某些实施方式中,减少骨吸收的血清标志物例如尿羟基脯氨酸、尿总吡啶诺林(PYD)、尿游离脱氧吡啶诺林(DPD)、尿I型胶原交联的N-端肽(NTX)、尿或血清I型胶原交联的C-端肽(CTX)、骨涎蛋白(BSP)、骨桥蛋白(OPN)和酒石酸盐抗性酸性磷酸酶5b(TRAP)的抗体剂量被认为是治疗有效量。在一实施方式中,在用结合TGF β 的抗体治疗后,骨吸收的血清标志物被减少大约5%至大约200%。

[0167] 在一实施方式中,在用结合TGFβ的抗体治疗后,骨吸收的血清标志物例如尿羟基脯氨酸、尿总吡啶诺林(PYD)、尿游离脱氧吡啶诺林(DPD)、尿I型胶原交联的N-端肽(NTX)、尿或血清I型胶原交联的C-端肽(CTX)、骨涎蛋白(BSP)、骨桥蛋白(OPN)和酒石酸盐抗性酸性磷酸酶5b(TRAP)被减少大约5%至大约10%、10%至大约15%、15%至大约20%、20%至大约25%、25%至大约30%、30%至大约35%、35%至大约40%、40%至大约45%、45%至大约50%、50%至大约55%、55%至大约60%、60%至大约65%、65%至大约70%、70%至大约75%、75%至大约80%、80%至大约85%、85%至大约90%、90%至大约95%、95%至大约100%、100%至大约105%、105%至大约110%、110%至大约115%、115%至大约120%、120%至大约125%、125%至大约130%、130%至大约135%、135%至大约140%、140%至大约145%、145%至大约150%、150%至大约155%、155%至大约160%、160%至大约165%、165%至大约170%、170%至大约175%、175%至大约180%、180%至大约185%、185%至大约190%、190%至大约195%或195%至大约200%。

[0168] 在某些实施方式中,增加骨沉积的血清生物标志物例如总碱性磷酸酶、骨特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白和I型前胶原(C-端/N-端)的抗体剂量被认为是治疗有效量。在一实施方式中,在用结合TGFβ的抗体治疗后,骨沉积的血清标志物被增加大约5%至大约200%。

[0169] 在某些实施方案中,在用结合TGFβ的抗体治疗后,骨沉积的血清生物标志物例如总碱性磷酸酶、骨特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白和I型前胶原(C-端/N-端)增加大约5%至大约10%、10%至大约15%、15%至大约20%、20%至大约25%、25%至大约30%、30%至大约35%、35%至大约40%、40%至大约45%、45%至大约50%、50%至大约55%、55%至大约60%、60%至大约65%、65%至大约70%、70%至大约75%、75%至大约80%、80%至大约85%、85%至大约90%、90%至大约95%、95%至大约100%、100%至大约105%、105%至大约110%、110%至大约115%、115%至大约120%、120%至大约125%、125%至大约130%、130%至大约135%、135%至大约140%、140%至大约145%、145%至大约150%、150%至大约155%、155%至大约160%、160%至大约165%、165%至大约170%、170%至大约175%、175%至大约180%、180%至大约185%、185%至大约190%、190%至大约195%或195%至大约200%。

[0170] 其它实施方式包括施用治疗有效剂量的抗体,其改善受OI影响的非骨骼器官的功能。例如,改善听觉、肺和/或肾功能的结合TGFβ的抗体的剂量被认为是治疗有效量。

[0171] 根据本发明的方法,给受试者施用的结合TGFβ的抗体的治疗有效量将取决于所述受试者的年龄和大小(如体重或体表面积),以及施用途径,和本领域普通技术人员公知的其它因素而有所不同。

[0172] 在某些示例性实施方式中,所述抗TGFβ抗体作为皮下剂量给受试者施用。施用的其它示例性方式包括但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、鼻内、硬膜外和经口途径。组合物可以通过任何便利的途径施用,例如通过输注和推注,通过经由上皮或粘膜层(如口腔黏膜、直肠和小肠粘膜等)的吸收,且可和其它生物学活性剂一起施用。施用可以是全身性施用或局部施用。所述TGFβ抗体可以肠胃外或皮下施用。

[0173] 多种递送系统是已知的并可以用于施用所述药物组合物,如,包囊化于脂质体中、微粒、微胶囊、受体介导的内吞(见例如Wu等(1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432)。所述治疗组合物将和合适的载体、赋形剂和其它被并入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受等药

剂一起施用。大量合适的制剂可以在全体药物化学家已知的处方集中找到:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括,例如,粉剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阴离子型或阳离子型)的小囊泡(如 LIPOFECTIN™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(不同分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有碳蜡的半固体混合物。也见Powell等"Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0174] 药物组合物可以制备成单位剂量的剂型以适于配合活性成分的剂量。此类单位剂量的剂型包括例如,片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿瓶)、栓剂等。

[0175] 药物组合物也可以使用任何可接受的装置或机构给受试者施用。例如,可以使用注射器和针或使用可重复使用的笔和/或自动注射器递送装置实现所述施用。本发明的方法包括使用多种可重复使用的笔和/或自动注射器递送装置来施用TGFβ结合物(或包含所述结合物的药物制剂)。此类装置的实例包括但不限于AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™笔 (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™ I、II和III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™笔 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), 仅列出少量。应用于皮下递送药物组合物的一次性笔和/或自动注射器递送装置的实例包括但不限于, SOLOSTAR™笔 (sanofi-aventis)、FLEXPEN™ (Novo Nordisk) 和KWIKPEN™ (Eli Lilly)、SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLETT™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.) 和HUMIRATM Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL), 仅列出少量。

[0176] 本文也考虑使用微输注器 (microinfusor) 来递送TGFβ结合物(或包含所述结合物的药物制剂)至受试者。如本文所用,术语“微输注器”指的是皮下递送装置,其设计为在延长的时间段内(如大约10、15、20、25、30或更多分钟)缓慢地施用大体积(如多达2.5mL或更多)的治疗制剂。见例如, U.S. 6,629,949; US 6,659,982; 和Meehan等, J. Controlled Release 46:107-116 (1996)。微输注器特别可用于递送大剂量的以高浓度(如大约100、125、150、175、200mg/mL或更高)包含在内的和/或粘稠溶液中的治疗性蛋白质。

[0177] G. 组合疗法

[0178] 在某些方面,本发明包括治疗OI的方法,所述方法包括给有需要的受试者施用结合TGFβ的抗体与至少一种额外的治疗剂组合的治疗。在本发明的方法的实践中可以与抗TGFβ抗体组合施用的额外的治疗剂的实例包括但不限于,双膦酸盐类、降钙素、特立帕肽和已知治疗、预防或改善受试者中成骨不全的任何其它化合物。在本方法中,所述额外的治疗剂可以与结合TGFβ的抗体同时地或顺序地施用。例如,对于同时施用,可以制备含有结合TGFβ的抗体以及至少一种额外的治疗剂两者的药物制剂。在一实施方式中,所述结合TGFβ的抗体和药物双膦酸盐类(如羟乙膦酸盐 (Etidronate)、氯屈膦酸盐 (Clodronate)、替鲁膦酸盐 (Tiludronate)、帕米膦酸盐 (Pamidronate)、奈立膦酸盐 (Neridronate)、奥帕膦酸盐 (Olpadronate)、阿屈膦酸盐 (Alendronate)、伊班膦酸盐 (Ibandronate)、唑来膦酸盐

(Zoledronate) 和利塞膦酸盐 (Risedronate)) 组合施用。在另一实施方式中,所述结合TGFβ的抗体和刺激骨形成的药物组合施用,例如甲状旁腺激素类似物和降钙素。在仍另一实施方式中,所述结合TGFβ的抗体和选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 组合施用。在本发明的方法的实践中与所述结合TGFβ的抗体组合使用的额外的治疗剂的量可以通过本领域已知的和容易获得的常规方法容易地测定。

实施例

[0179] OI是全身性结缔组织疾病,其中受影响个体展现I型胶原纤维形成的不正常(其由于I型胶原的α1或α2链一级序列中的突变),以及I型胶原翻译后修饰和结合I型胶原纤维的蛋白的不正常。CRTAP编码称作软骨相关蛋白的蛋白,其是脯氨酰-3-羟化复合物的成员,作用是帮助I型胶原的正确折叠、翻译后修饰和分泌。CRTAP的突变负责VII型成骨不全。缺乏Crtap基因的小鼠 (Crtap^{-/-}) 展现模拟成骨不全的表型,并且用作该疾病的模型 (Morello等,2006)。Crtap^{-/-}小鼠和年龄匹配的野生型 (WT) 同窝对照用于如下实施例。

[0180] 材料和方法

[0181] 动物、抗TGFβ治疗和组织收集

[0182] 在混合的C57Black/6J/129Sv遗传背景上产生和维持Crtap^{-/-}小鼠。获得在Col1a2基因中携带G610C突变的小鼠 (Col1a2^{tm1.1Mcbr}) 并与野生型C57B1/6J小鼠繁育。对Col1a2^{tm1.1Mcbr}等位基因为杂合的小鼠用于实验。获得应答于Smad2/3依赖型TGFβ信号传导途径而表达萤光素酶的TGFβ报道子小鼠 (SBE-Luc小鼠) 并与Crtap^{+/-}小鼠繁育2代以生成Crtap^{-/-}小鼠和表达所述报道子基因的同窝野生型。全部小鼠圈养于动物饲养所,且遵循Animal Care and Use Committee (IACUC) 批准的方案进行动物实验。

[0183] 对于蛋白和RNA分析,分离P3小鼠的颅盖,清除骨外组织,并在液氮中速冻。对于Crtap^{-/-}P10小鼠肺的免疫染色,在处死后各小鼠的肺立即同等地用4%多聚甲醛以恒定的25cm H₂O的压力通过重力膨胀,然后在气管处缝合。然后轻柔地从胸腔摘除肺并固定于4%多聚甲醛中过夜。

[0184] 八周龄的雌性Crtap^{-/-}和Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠用泛-TGFβ中和抗体1D11处理8周 (10mg/kg体重, I.P., 每周注射3次)。对照Crtap^{-/-}、Col1a2^{tm1.1Mcbr}和WT小鼠接受相同IgG1同种型的对照抗体 (13C4)。在处理,处死小鼠,收集腰椎和股骨并固定于10%福尔马林中用于微型CT和骨组织形态测定。Crtap^{-/-}小鼠的对侧股骨储存于-20℃,包裹于盐水浸湿的纱布,直到进行生物力学测试。这些Crtap^{-/-}小鼠的肺如P10小鼠一样相等地膨胀,收集并固定。在处理期间不可能盲试,因为1D11和对照抗体根据分组注射。在全部随后分析中,研究者不知道基因型和处理组。

[0185] 免疫印迹

[0186] 蛋白提取自速冻P3颅盖样品,转移至300μl裂解缓冲液 (0.0625M Tris-HCl pH 7.5、2% SDS、5mM NaF、2mM Na₃VO₄和Roche Complete蛋白酶抑制剂) 并均质化1分钟,随后在95℃孵育40分钟。将上清液转移至Centrifugal Filter Units/Amicon Ultra 3K (Millipore) 并离心以浓缩蛋白。使用Micro BCA试剂 (Pierce) 遵循制造商说明测量裂解物中总蛋白浓度。将40μg的颅盖蛋白提取物悬浮于含有5% 巯基乙醇的Laemmli缓冲液并在Mini Protean TGX SDS-PAGE凝胶 (梯度4-20%; Bio-Rad) 上分离并转移至PVDF膜上用于蛋

白印迹分析。PVDF膜用pSmad2单克隆抗体孵育 (Cell Signaling#3108, 1:750于含5%BSA的TBST过夜), 之后是二抗HRP-连接的抗-兔抗体 (GE, 1:5000于含5%BSA的TBST中2小时), 用ECL Plus Western Blotting Detection System (GE) 处理并曝光于X射线胶片。随后, 使用ReBlot Plus试剂 (Millipore) 从膜剥离抗体, 并和Smad2单克隆抗体一起孵育 (Cell Signaling#5539, 1:2000于含5%BSA的TBST中过夜), 之后是类似的二抗孵育及ECL介导的显影。扫描X射线胶片并使用ImageJ软件 (National Institutes of Health) 定量各带的密度。

[0187] 定量实时PCR

[0188] 使用Trizol试剂 (Invitrogen) 从速冻P3小鼠提取总RNA。使用Superscript III RT系统 (Invitrogen) 根据生产商说明从总RNA合成cDNA。在LightCycler.v 1.5 (Roche) 使用基因特异性引物和SYBR Green I试剂 (Roche) 进行定量RT-PCR。 $\beta 2$ -微球蛋白用作标准化cDNA浓度的参考基因。

[0189] 体内生物荧光成像

[0190] 向表达TGF β -报道子转基因 (SBE-Luc小鼠) 的P10 Ctrap^{-/-}小鼠和同窝野生型注射D-荧光素 (Goldbio, 150mg/kg, IP), 用异氟醚麻醉, 在注射后10分钟用生物荧光成像系统 (Xenogen) 成像。

[0191] 原代成骨细胞培养、TGF β -报道子细胞

[0192] 从大约2月龄的Crtap^{-/-}和野生型小鼠的胫骨和股骨分离骨髓细胞并在含有10% FBS、100U/mL青霉素和100ug/mL链霉素的 α -MEM中培养。每两天更换培养基并弃去未贴壁细胞。7天后, 贴壁细胞, 定义为骨髓基质细胞 (BMSC), 以 2.5×10^4 个细胞每 cm^2 重新接种至24孔板并在成骨性培养基 (α -MEM, 10%FBS、500 μ M抗坏血酸和10mM β -甘油磷酸酯) 中培养3天。收集条件处理的培养基并和PAI-荧光素酶报道子貂 (mink) 肺上皮细胞一起孵育。在24小时后, 收集细胞裂解物用于荧光素酶活性测定, 其通过使用Dual-Luciferase Reporter System (Promega) 测量。结果标准化至使用Micro BCA试剂 (Pierce) 定量的总蛋白量。

[0193] 微型CT、骨组织形态测定

[0194] 使用Scanco μ CT-40微型CT扫描腰椎骨和股骨用于定量小梁和骨皮质参数。通过手工外形修复椎体L4的小梁骨以及股骨的远端干骺端截面, 使用Scanco分析软件分析椎骨和股骨小梁骨参数。在股骨骨干中央处的骨皮质参数使用所述软件中包含的自动阈值算法进行定量。

[0195] 扫描的未脱钙Crtap^{-/-}小鼠脊柱样品然后包埋与塑料中用于切片。使用标准方案进行甲苯胺蓝染色和TRAP染色用于使用Bioquant Osteo Image Analysis System分别可视化 and 定量Ob's和Oc's。

[0196] 免疫染色和组织学

[0197] 对于免疫组织化学, 收集P5小鼠的后肢, 在4%多聚甲醛中固定过夜并包埋于石蜡中。在脱蜡和再水合后, 进行热诱导的抗原恢复 (Dako, S1700), 随后用透明质酸酶 (2mg/ml; Sigma) 处理30分钟。内源过氧化物酶用3%过氧化氢封闭10分钟。在和封闭溶液孵育后 (3%正常山羊血清, 0.1%BSA, 0.1%Triton X-100于PBS中), 切片在针对TGF β 1 (G1221, Promega) 和核心蛋白多糖 (LF-113, 由Larry Fisher, National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, MD, USA馈赠) 的抗体中在37C孵育60min (各自1:25稀释

于PBS,对照样品仅在PBS中孵育),随后和二抗孵育(SuperPicTure Ploymer Detection试剂盒,Invitrogen)。根据生产商推荐加入底物DAB,样品脱水并使用Cytoseal XYL基于二甲苯的封装介质(Thermo Scientific)封装。WT和同窝突变体的切片在相同时间处理。对WT和同窝突变体使用相同曝光时间用光学显微镜(Axioplan 2,Zeiss)拍摄小梁骨图像。

[0198] P10和16周龄Crtap^{-/-}小鼠的肺在组织收集期间相等地膨胀,固定于4%多聚甲醛中,并石蜡包埋。P10Crtap^{-/-}和野生型小鼠的肺用于针对pSmad2免疫染色。简言之,石蜡切片用二甲苯处理,再水合,并加热20分钟用于抗原恢复(pH 6;Dako)。切片然后在封闭溶液(3%正常驴血清,0.1%BSA,0.1%Triton X-100于PBS中)中孵育,随后和兔抗-pSmad2抗体(1:500)(Cell signaling,#3108)孵育,缀合Alexa flour 594的驴抗-兔二抗(1:600)(Invitrogen)孵育,并用具有DAPI的Prolong Gold抗褪色试剂(Invitrogen)封装。使用Zeiss显微镜(Axiovision Software)使用相同曝光时间拍摄这些切片的荧光图像。

[0199] 对于16周龄小鼠的肺组织学和形态测量,旁矢状面切片使用苏木精和伊红染色的标准方案染色。使用平均线性截距(MLI)方法定量肺泡结构之间的距离。简言之,使用光学显微镜(Axioplan 2,Zeiss),每小鼠在20X放大率下捕获来自两个肺的全部肺叶的10个组织学视野。使用修改的ImageJ软件(National Institutes of Health,由Paul Thompson修改)测量MLI。在人工去除血管、大的气道和其它非肺泡结构后,所述软件自动设定各图像的肺泡组织阈值,并将由1353行(每行测量21像素)组成的线网覆盖于所述图像。截断肺泡组织的行数用于计算MLI。

[0200] 通过3点弯曲测试生物力学

[0201] 通过三点弯曲使用6mm弦长用Instron 5848装置(Instron Inc.,Norwood MA)测试Crtap^{-/-}和WT股骨。全部股骨在室温润湿测试。它们以0.05N/s的速率进行5秒预负荷至1N。在预负荷后,股骨以0.1mm/秒的速率负荷至被破坏。负荷和位移数据使用BLUEHILL软件(Instron 5848)在40Hz速率捕获。

[0202] 为了测定屈服点,鉴定负荷-位移曲线上在预负荷之后和最大负荷之前的区域。该区域被分成5段,取该段具有最大斜率的拟合线。然后,在所述线上应用0.012的偏移量(offset)。偏移线和负荷-位移曲线交点为0.012偏移屈服点。该屈服点更接近地对应于0.2%偏移应变(在文献中经常选择)。弹性区域鉴定为预负荷完成至屈服点的区域。屈服后区域鉴定为从屈服点至负荷变化超出-1N的点的区域,表示破坏。弹性位移是样本保持在弹性区期间的位移。屈服后位移是样本保持在屈服后区域期间的位移。总位移计算为弹性位移和屈服后位移的和。使用梯形数值积分方法,到达破坏的能量计算为负荷-位移曲线下的面积。通过发现在样本破坏前,由BLUEHILL记录的最高负荷值确定最大负荷。为了计算刚度,对负荷-位移曲线的弹性区的最陡段应用最小二乘拟合法。刚度是最小二乘拟合线的斜率。获得自股骨干的微型CT分析的几何数据(直径和转动惯量)用于计算固有材料特性:极限强度、对破坏的韧性和弹性模量。

[0203] 血清骨更新(turnover)标记物

[0204] 使用来自Biomedical Technologies Inc.的Mouse Osteocalcin EIA Kit定量血清骨钙蛋白(OCN)。骨胶原的C-端交联端肽(CTX)使用来自Immunodiagnostic Systems Ltd的RatLapsTM EIA Kit进行定量。两种分析均根据生产商说明进行。

[0205] 胶原SDS-PAGE、质谱和交联分析

[0206] 从Crtap^{-/-}和野生型胫骨制备I型胶原用于质谱。骨用氯仿/甲醇(3:1v/v)脱脂并在0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.5中去矿物质化, 全部步骤在4℃进行。将骨精细地粉碎并通过在SDS-PAGE样品缓冲液中热变性(90℃)将胶原溶解。从SDS-PAGE凝胶切下胶原 α -链并进行胶内胰蛋白酶消化。使用装配有在线液相色谱(LC) (ThermoFinnigan)的LCQ Deca XP离子阱质谱仪对胰蛋白酶肽进行电喷射MS, 使用C8毛细管柱(300 μ m x 150mm; Grace Vydac 208 MS5.315)以4.5 μ l/min洗脱。使用Sequest搜索软件(ThermoFinnigan)使用NCBI蛋白数据库用于肽鉴别。

[0207] 在6N HCl中水解去矿物质化的骨后, 通过HPLC定量吡啶诺林交联物(HP和LP)。

[0208] 表面等离子体共振分析

[0209] 使用BIAcore X仪器(GE Healthcare Bio-Science Corp.)进行表面等离子体共振实验。来自野生型和Crtap^{-/-}小鼠的经纯化的天然小鼠腱I型胶原通过酰胺偶联分别以大约0.05ng/mm² (500RU) 和0.08ng/mm² (800RU) 的浓度固定化于CM5传感器芯片上。以10 μ l/min的流速和20℃在HBS-P缓冲液(10mM Hepes缓冲液, pH 7.4, 含有150mM NaCl和0.005%表面活性剂P20)进行所述实验。将重组人核心蛋白多糖核心蛋白(R&D systems)注射至两种I型CM5芯片上。人核心蛋白多糖的储液浓度通过氨基酸分析确定。核心蛋白多糖对野生型和Crtap^{-/-}小鼠I型胶原的结合应答通过CM5传感器芯片上固定化的I型胶原的量进行标准化。使用三种浓度的核心蛋白多糖(3、5和12 μ M), 各浓度的分析重复三次。该实验用每次分离自不同小鼠的胶原进行两次。

[0210] 统计学方法

[0211] 两组之间的比较使用非配对、双尾学生T检验进行。对于3组之间的比较, 如果确认组间等方差, 进行单因素方差分析(ANOVA), 之后使用Holm-Sidak方法进行全部配对多重比较。如果等方差检验失败, 进行秩和Kruskal-Wallis单因素ANOVA, 之后是使用Tukey检验的全部配对多重比较。对于学生T检验、ANOVA和秩和Kruskal-Wallis单因素ANOVA, 小于0.05的P值被认为是统计学显著的。对于事后配对多重比较, 各P值与取决于P值的秩和总比较数目(以确定是否组间差异是显著的)的临界水平进行比较。Sigma Plot V11.0(Systat Software Inc.)用于统计学分析。

[0212] 1D11对OI小鼠的骨和肺的作用在研究开始时是未知的。为了确定每组小鼠初始样本大小, 我们计算出为了以90%功效检测出1D11和对照处理的OI小鼠之间由微型CT确定的骨量(BV/TV)的20%的最小差异, 需要8只小鼠的组大小。

[0213] 实施例1: Crtap^{-/-}颅盖中改变的TGF β 信号传导

[0214] 分析Crtap^{-/-}小鼠和年龄匹配的同窝野生型(WT)对照的活化pSmad2(TGF β 信号传导途径的成员), 以及TGF β 的其它下游靶的表达。切下颅盖骨并提取RNA和蛋白质, 分别通过实时-PCR和蛋白印迹分析。如可见于图1A和1B, 与野生型小鼠相比, Crtap^{-/-}小鼠具有高100%的pSmad2与总Smad2的比率, 其通过蛋白印迹测定并通过密度计量定量, 表明TGF β 信号传导在Crtap^{-/-}小鼠中被升高。TGF β 的转录靶, 例如Col1a1和p21, 相比于WT对照被升高, 如通过RT-PCR所测量的并分别阐述于图1C和图1D。测量原纤维变性ECM蛋白结缔组织生长因子(CTGF)并发现相比于WT对照, 在Crtap^{-/-}小鼠中高大约50%, 其通过RT-PCR测定并阐述于图1E。如图1F所示, RT-PCR分析揭示细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27的表达在Crtap^{-/-}或WT小鼠中均没有被改变。

[0215] 实施例2:在Crtap^{-/-}小鼠体内和在crtap^{-/-}成骨细胞中增加的TGFβ活性

[0216] 将Crtap^{-/-}小鼠与应答于TGFβ信号传导活化而表达萤光素酶的TGFβ报道子小鼠(Jackson Laboratory;B6.Cg-Tg (SBE/TK-luc) 7Twe/J) 杂交。用底物D-萤光素(150mg/kg)在成像前10分钟注射至P9小鼠。如图2A所示,与WT对照相比,Crtap^{-/-}小鼠在其尾部、长骨和颅盖具有高得多的荧光,表明crtap^{-/-}小鼠中增加的TGFβ活性。图2B,颅盖处萤光素酶的活性的定量。

[0217] 骨髓基质细胞(BMSC)分离自Crtap^{-/-}小鼠和WT小鼠,在成骨性条件下离体培养,而条件处理的培养基针对TGFβ活性使用应答TGFβ信号传导的活化而表达萤光素酶的细胞系进行分析。如图2C所示,与来自WT小鼠的BMSC相比,来自Crtap^{-/-}BMSC的条件处理的培养基导致所述报道子细胞系高接近两倍的萤光素酶活性。总言之,这些数据表明TGFβ分泌和活性在Crtap^{-/-}小鼠的骨和成骨细胞中升高。

[0218] 实施例3:Crtap^{-/-}椎骨的μCT分析

[0219] 成年8周龄Crtap^{-/-}小鼠(N=6每组)施用1D11(10mg/kg,I.P.,3次/周,共8周),结合TGFβ的泛特异性抗体的鼠替代物,其包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。不相关的13C4抗体施用至单独组的Crtap^{-/-}小鼠和WT小鼠作为对照(n=6)。16周龄小鼠的L4椎体(从8-16周处理)通过μ-CT成像。来自用TGFβ中和抗体1D11(Genzyme;10mg/kg,I.P.;3次/周)处理8周的8周龄Crtap^{-/-}小鼠(n=6每组)以及用对照抗体(13C4安慰剂)处理的野生型(WT)和对照Crtap^{-/-}小鼠的椎体L4的微型CT数据示于图3。如图3所示,相比于WT对照椎骨,Crtap^{-/-}椎骨是多孔的。然而,1D11处理导致与WT条件可比的骨骼表型。

[0220] 来自图3的数据定量于图4,用泛特异性抗TGFβ抗体处理拯救Crtap^{-/-}小鼠的骨骼表型。在测量的参数中,来自经处理的Crtap^{-/-}小鼠的椎骨统计学上类似于WT对照小鼠,所述参数包括骨体积密度(BV/TV)、总骨表面积(BS)、骨表面积密度(BS/BV)、小梁数目(Tb.N)、小梁厚度(Tb.Th)、小梁间隙(Tb.Sp)和总体积(Dens TV)。

[0221] 实施例4:抗-TGFβ处理的Crtap^{-/-}椎骨的组织形态测定

[0222] 除了μ-CT外,抗体处理的、安慰剂处理的和WT小鼠的椎骨通过组织形态测定进行分析。如图5A和5B所示,μ-CT结果通过组织形态测定分析确认。此外,组织切片针对破骨细胞标志物TRAP的表达进行染色。分析揭示与WT对照相比,Crtap^{-/-}小鼠中有更多破骨细胞覆盖更多的骨表面积(N.Oc/BS和Oc.S/BS),表明增加的破骨细胞活性。用1D11抗TGFβ处理将全部破骨细胞特异性参数降低至低于WT数目。因此,鉴定破骨细胞为TGFβ抗体的潜在靶,更具体而言,泛特异性抗TGFβ抗体的潜在靶。

[0223] 实施例5:抗TGFβ处理的Crtap^{-/-}股骨的三点弯曲测试

[0224] 在16周龄小鼠切除的股骨上进行生物力学测试(在从8-16周的处理后),使用标准三点弯曲测试,使用Instron 5848装置(Instron Inc.,Norwood MA),弦长6mm,以1N/s速率预负荷5秒至1N。在预负荷后,股骨以0.1mm/秒的速率压迫至破坏。负荷和位移数据使用BLUEHILL软件(Instron 5848)在40Hz速率捕获。

[0225] 如图6所示,相比于WT对照小鼠,Crtap^{-/-}小鼠股骨较不坚硬且能够经受显著较小的最大负荷。1D11处理的Crtap^{-/-}小鼠的股骨显示显著改善的最大负荷,以及与对照crtap^{-/-}小鼠相比增加的刚度的趋势。

[0226] 因此,用1D11泛特异性抗TGF β 抗体处理定量地、定性地和生物力学地恢复Crtap $^{-/-}$ 小鼠的骨骼表型。

[0227] 实施例6:用1D11抑制TGF β 信号传导改善肺表型

[0228] Crtap $^{-/-}$ 小鼠具有全身性结缔组织疾病,表现为低骨量、肾小球硬化和肺发育异常(Baldrige等;PLoSone,5(5):e10560(2010))。在Crtap $^{-/-}$ 小鼠的肺中看见增加的TGF β 表达,如针对pSmad2的免疫染色阳性所证明的以及如图7A所示。组织学上,相比于WT小鼠,Crtap $^{-/-}$ 小鼠展现增加的远端气道空间,如图7B中所示。1D11处理(10mg/kg,IP,3x/周,处理8周)降低Crtap $^{-/-}$ 小鼠中pSmad2表达并减小远端气道空间并改善肺表型,如图7A和图7B所示并定量于图7C(*P<0.05vs.对照Crtap $^{-/-}$;每只小鼠分析10张图像,每组n=8只小鼠)。

[0229] 实施例7:Crtap $^{-/-}$ 肺中的核心蛋白多糖表达

[0230] 研究TGF β 表达的转录调控物以了解Crtap $^{-/-}$ 小鼠的骨和肺中TGF β 信号传导失调的基础。可以在ECM中调控TGF β 的主要类别的细胞外蛋白包括富含亮氨酸的小蛋白多糖(SLRP),例如核心蛋白多糖。免疫染色揭示与WT对照肺相比,核心蛋白多糖在Crtap $^{-/-}$ 肺中增加的表达,如图8所示。

[0231] 由于核心蛋白多糖是成熟TGF β 的调控物,该发现提示改变的胶原翻译后修饰,如在OI中出现的,改变ECM蛋白包括SLRP的相互作用。核心蛋白多糖结合羟脯氨酸位点,例如位于I型和II型胶原氨基酸残基396处的位点,其不存在于Crtap $^{-/-}$ 小鼠中。进行核心蛋白多糖结合测定来确定核心蛋白多糖结合是否在OI中被改变,以及这是否部分负责在Crtap $^{-/-}$ 骨和小鼠中观察到的表型。如图9所示,结合3-羟基化胶原肽(如在I型和II型胶原中)的核心蛋白多糖多于没有3-羟基化的胶原多肽(如在III型胶原中)。

[0232] 实施例8:增加的TGF β 信号传导是成骨不全中的共同机制

[0233] OI表征为脆骨、低骨量、骨畸形和骨折。此外,骨外表现包括肺异常本质上对发病率和死亡率有作用。OI的大部分例子由编码I型胶原的基因(COL1A1和COL1A2)中的常染色体显性突变引起。最近几年,已经鉴别在编码参与胶原翻译后修饰的蛋白的额外基因中的突变是隐性形式OI的原因。最早描述的位于软骨相关蛋白(CRTAP)中,其是负责I型胶原脯氨酸残基986 α 1(I)的3-羟基化的脯氨酰-3-羟化酶复合物的成员。次形态CRTAP突变导致纤维胶原中3-羟基脯氨酸(3Hyp)的部分损失以及其它残基的过度修饰,并导致隐性VII型OI,其临床上与显性形式的严重OI重叠。3Hyp的生理学功能并不完全了解,但生物化学研究提示其可能参与胶原-蛋白相互作用,而不是负面影响胶原稳定性。

[0234] ECM是信号传导分子和它们的调控物的重要储库。在骨中,通过偶联骨吸收性破骨细胞和骨形成性成骨细胞的局部活性,TGF β 充当骨重建的中央协调物。TGF β 由成骨细胞大量产生,主要以非活性潜伏形式分泌,并被沉积至骨基质中。在此处,在破骨细胞的骨吸收期间,它可以被释放并活化。作为额外水平的调控,活性TGF β 可以被蛋白多糖结合,所述蛋白多糖调节其与胶原原纤维相关的生物活性。因为I型胶原是骨中ECM最丰富的组分,这给出有趣的假设,即在OI中观察到的胶原结构的改变不仅仅增加骨脆性,而且还影响骨基质的信号传导储库功能。有趣的是,Crtap $^{-/-}$ 小鼠显示和具有增加TGF β 信号传导的动物模型的表型重叠。例如,TGF β 过表达导致低骨量。此外,Crtap $^{-/-}$ 小鼠在肺中显示肺泡气道空间的扩大,类似于在马方综合征(Marfan syndrome)的小鼠模型中观察到的,其中增加的TGF β 信号传导已经显示为肺病理学的主要促成者。因此,如果隐性OI,在Crtap $^{-/-}$ 小鼠中研究TGF β 信

号传导的状态。

[0235] 为了评估骨中的TGF β 信号传导状态,评估Crtap^{-/-}小鼠的颅盖骨中TGF β 靶基因的表达水平。与野生型(WT)样品相比,Crtap^{-/-}骨显示TGF β 下游靶p21(细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1)、PAI-1(纤维蛋白溶酶原活化物抑制剂-1)和Col1a1增加的表达,与升高的TGF β 活性一致(图10A)。为确认胞内TGF β 信号传导途径的增加的活化,评估了Smad2的状态,Smad2是胞内第二信使蛋白,其在TGF β 受体活化后被磷酸化。与靶基因表达一致,免疫印迹分析显示在Crtap^{-/-}小鼠的骨样品中磷酸化Smad2(pSmad2)与总Smad2的更高的比率,表明增加的TGF β 信号传导(图10B和10C)。

[0236] 为了确定是否这些静态测量反映增加的体内TGF β 活性,Crtap^{-/-}小鼠和在TGF β -应答Smad结合元件控制下表达萤光素酶的TGF β -报道子小鼠(SBE-Luc小鼠)杂交。与同窝WT/SBE-Luc相比,Crtap^{-/-}/SBE-Luc小鼠显示在骨骼结构上增加的生物荧光面积,表明增加的体内TGF β 活性(图10D)。在3窝中,Crtap^{-/-}小鼠显示与WT小鼠相比在头/颅盖处平均2.86倍(SD $\pm$ 0.34)的生物荧光信号。此外,为了测试与Crtap损失相关的增加的TGF β /Smad信号传导是骨固有的,即组织自发的,体外将骨髓基质细胞(BMSC)分化成成骨细胞。通过使用TGF β 报道子细胞系,发现与来自WT BMSC的培养基相比,来自Crtap^{-/-}BMSC的条件处理的培养基展现更高的TGF β 活性(图10E)。总言之,这些发现表明Crtap的损失以组织自发方式增强骨中TGF β 信号传导。

[0237] 具有严重OI的患者也能展现固有肺异常,且呼吸衰竭是这些个体的主要死亡原因之一。有趣的是,Crtap^{-/-}小鼠显示肺泡气道空间的弥散增加,其是与其他发育模型中增加的TGF β 信号传导相关的特征。因此,Crtap^{-/-}小鼠的肺在肺泡细胞中显示增加的对pSmad2的胞内染色,表明增加的TGF β 活性也存在于骨外组织中(图10F)。

[0238] 为了理解增加的TGF β 信号传导是否代表促成Crtap^{-/-}小鼠中骨和肺表型的原因机制,用泛-TGF β 中和抗体(1D11)进行拯救实验。八周龄的Crtap^{-/-}小鼠用1D11处理8周;对照Crtap^{-/-}和WT小鼠接受非特异性对照抗体(13C4)。1D11并不显著改变处理的Crtap^{-/-}小鼠的体重,表明TGF β 抑制并不影响一般营养状态(图14)。此外,质谱和交联分析显示1D11并不显著改变Crtap^{-/-}小鼠中I型胶原P9863-羟基化的状态或胶原交联,提示失调的TGF β 信号传导是改变的分子胶原结构的结果,且不直接参与胞内胶原加工和胞外原纤维组装(图15)。Crtap^{-/-}小鼠展现降低的骨量和不正常的小梁骨参数(图11A和11B)。椎骨的微型CT成像分析阐明与对照Crtap^{-/-}小鼠相比,TGF β 抑制显著将小梁骨参数,包括骨体积/总体积、小梁数目和小梁厚度改善至接近WT水平(图11A和11B,以及图17)。在Crtap^{-/-}小鼠中的股骨小梁骨中观察到类似有益效果,其中TGF β 抑制显著地改善小梁骨参数(图18)。在WT小鼠和Es1-1^{-/-}小鼠11(由于正常TGF β 成熟中的缺陷而增加TGF β 活性的模型)中,之前已经报道用1D11抑制TGF β 对骨骼的作用。尽管在WT小鼠的脊柱中1D11中度增加小梁BV/TV 30%,而Es1-1^{-/-}小鼠显示BV/TV的106%的增加。这提示在TGF β 在骨骼中被增加的病理生理情况中靶向TGF β 能够导致相对地更显著的正面作用。在本研究中,1D11使Crtap^{-/-}小鼠脊柱处的小梁BV/TV增加235%,支持了失调的TGF β 信号传导是Crtap^{-/-}小鼠中低骨量的重要促成者。在股骨骨干处,与WT小鼠相比,Crtap^{-/-}小鼠中皮质体系结构的参数包括皮质厚度、直径、横切面积和横切转动惯量被显著降低。在1D11处理之后,这些参数与WT小鼠的区别不再显著(图19)。为了测试皮质和小梁骨中的这些改变是否翻译成改善的骨强度,通过3-点弯曲进行股骨的生物力

学测试。发现TGF β 抑制能够增加处理的Crtap^{-/-}小鼠中的最大负荷和极限强度,表明改善的全骨和组织强度和改善的对骨折的抗性。然而,1D11处理对于OI骨的增加的脆性没有作用,如对照和1D11处理的Crtap^{-/-}小鼠中降低的屈服后位移所表明的(图20)。这可能反映了与改变的胶原结构相关的先天异常矿化。总的而言,这些发现表明增加的TGF β 信号转导是由Crtap缺陷造成的隐性OI中的骨表型的主要促成因素,且抑制失调的TGF β 信号传导,恢复骨量、微结构参数并改善全骨强度。

[0239] 为了理解Crtap^{-/-}小鼠中TGF β 抑制在细胞水平的作用,在处理的小鼠上进行组织形态测定。在该研究中的椎体切片中,发现与WT小鼠相比,对照Crtap^{-/-}中每骨表面积增加的破骨细胞(0c)和成骨细胞(0b)数目,表明在脊柱中增加的骨重建(图11C和图21)。一致地,血清骨更新标志物骨钙蛋白(OCN)和骨胶原的C-端交联端肽(CTX)在8周龄(OCN和CTX)和16周龄(仅CTX)对照Crtap^{-/-}小鼠中升高(图19)。在具有显性和隐性OI的患者中已经描述骨细胞组分中的类似变化,显示增加的0c和0b数目与增加的骨更新一致。有趣的是,具有增加的TGF β 信号传导的小鼠模型也显示低骨量,伴随增加的破骨细胞骨吸收和不正常的骨重建。TGF β 对骨细胞的作用的大多数报道与这样的模型一致,其中TGF β 能够刺激在骨修复位点处的0c和0b前体的招募和初始分化,随后是胰岛素样生长因子(IGF-1)介导的0b分化。然而,在持续的高剂量,通过抑制分化因子RUNX2,TGF β 能够抑制0b分化。考虑到对0c/0b相互作用的决定性作用,TGF β 可用性的微调是在骨重建期间局部偶联骨吸收和骨形成的关键因素,且其不平衡可导致显著的骨病变。

[0240] 与在对照Crtap^{-/-}小鼠中的发现相反,用1D11处理的Crtap^{-/-}小鼠的切片显示减少的0c和0b数目,其甚至低于在WT小鼠中测量到的值,表明在该实验中使用的1D11的剂量下TGF β 抑制造成的失调骨重建的超生理学抑制(supraphysiologic suppression)(图11C)。与较早的报道一致,0c's和0b's降低至低于WT水平的观察结果也印证了在骨重建过程期间生理学需要局部量的TGF β 以正常协调0c's和0b's。我们的发现不同于之前在WT小鼠中的研究,其中1D11处理减少0c数目但增加0b数目。这可能反映了TGF β 抑制在病理生理学情况中不同的细胞作用,所述病理生理学情况具有增加TGF β 信号传导以及相比于WT小鼠中正常骨增加的骨重建。已经显示TGF β 抑制成骨细胞前体细胞的分化,且增加的TGF β 信号传导能够由此导致更高比例的未成熟成骨细胞谱系细胞。在另一方面,在骨表面上未成熟0b's增加的数目或更高的比例能够导致增加的由这些细胞分泌的TGF β 的量。用1D11抑制TGF β 显著降低Crtap^{-/-}小鼠中增加的0b数目的发现提示增加的TGF β 信号传导是促成成骨细胞谱系细胞增加的原因。

[0241] 除了关于0c和0b数目的发现,观察到对照Crtap^{-/-}小鼠中更高的每骨面积骨细胞(0t)数目,其在1D11处理的Crtap^{-/-}小鼠中被降低至与WT小鼠中的那些可比较的水平(图11C和图21)。在OI患者中,在具有所述疾病更严重形式的个体中已经观察到增加的0t密度,很可能反映由于OI骨中生理学成熟的缺陷而存在未成熟原骨(primary bone)。与我们增加的TGF β 信号传导促成OI中的骨病理学的假设一致,在WT小鼠中过表达TGF β 类似地导致增加的0t密度。作为可能的解释,在0b's向0t's转换期间,TGF β 能够抑制0b凋亡,并由此导致增加的0t密度。总而言之,这些发现表明增加的TGF β 信号传导促成Crtap^{-/-}小鼠中高骨更新状态和受损的骨成熟,以及表明失调的TGF β 信号传导的抑制逆转这些细胞变化。

[0242] 考虑到对0c/0b相互作用的这些决定性作用,TGF β 可用性的微调是在骨重建期间

局部偶联骨吸收和骨形成的关键因素,且其不平衡可导致显著的骨病变。我们的发现表明在Crtap^{-/-}小鼠中抑制失调的TGFβ信号传导恢复骨量以及微结构参数,改善全骨强度,并逆转在Crtap^{-/-}小鼠中观察到的细胞变化。因此,TGFβ信号传导失调是隐性OI的该小鼠模型中骨表型的重要促成因素。

[0243] 我们还对TGFβ抑制是否影响Crtap^{-/-}小鼠的肺表型感兴趣。对照Crtap^{-/-}小鼠的肺显示相比于WT小鼠远端气道空间的增加(图11D)。有趣的是,用TGFβ中和抗体处理的Crtap^{-/-}小鼠的肺显示肺泡结构之间距离的60%的改善(图11D和11E)。该发现表明过度TGFβ信号传导也是Crtap^{-/-}小鼠中肺异常的重要致病促成因素。已经将增加的TGFβ信号传导与肺发育异常以及成熟肺中的疾病相联系。例如,肺中TGFβ过表达导致具有扩大的气道空间面积的受损的肺发育,且增加的TGFβ信号传导是马方综合征以及肺气肿和支气管哮喘发展中肺异常的起作用的致病机制。我们的结果表明过度TGFβ信号传导也是Crtap^{-/-}小鼠中肺异常的重要致病促成因素。考虑到Crtap^{-/-}小鼠中用1D11部分拯救肺表型,有可能除了在TGFβ抑制能够改善所述表型的较晚时期维持肺组织之外,当解剖结构建立的时候,失调的TGFβ信号传导影响肺组织发育。

[0244] 所问的下一个问题是由于Crtap缺失(导致丧失在P986处的3Hyp以及胶原翻译后过度修饰)导致的胶原中的变化如何导致失调的TGFβ信号传导。生物化学分析表明胶原脯氨酰-3-羟基化并不根本地影响胶原分子的稳定性,但相反地其可能影响胶原-蛋白相互作用。一种有吸引力的假设是3Hyp的缺失能够影响胶原和富含亮氨酸的小蛋白多糖(SLRP)的相互作用。SLRP已知结合I型胶原和TGFβ两者,且由此调节TGFβ活性。例如,SLRP核心蛋白多糖能够在骨肉瘤细胞中抑制TGFβ的不同作用,而其在成骨细胞前体细胞中增强TGFβ活性。提示核心蛋白多糖在I型胶原上的结合区域集中于三螺旋结构域的残基961/962处,其位置紧密邻近P986残基(在OI中由于Crtap缺陷而未羟基化)。因此,有可能P9863Hyp位置标记核心蛋白多糖和I型胶原结合的相互作用位点,由此介导成熟TGFβ至胶原的隔离(sequestration)。

[0245] 因此,假设结合胶原的核心蛋白多糖对于TGFβ调控是关键的,并且该结合被改变的胶原结构打断,例如被在隐性OI的情况中I型胶原α1链中P986翻译后3-脯氨酰-羟基化修饰的丧失打断。鉴定到尽管Crtap缺失并不改变颅盖骨中核心蛋白多糖和其它SLRP的RNA表达(图12A),也不改变核心蛋白多糖在小梁骨中的定性丰度(图24),其的确降低重组核心蛋白多糖核心蛋白与分离自Crtap^{-/-}小鼠的I型胶原的结合(相对于WT小鼠)(图12B)。WT和Crtap^{-/-}小鼠的I型胶原与重组核心蛋白多糖核心蛋白的结合的表面等离子体共振分析测量证明在所测试的三种浓度在Crtap^{-/-}小鼠中降低的结合(图23)。来自两个独立生物学重复(◆重复1、▲重复2)的核心蛋白多糖进行各个所指明浓度的三个技术重复。结果显示为WT平均值的百分比(条表示每组平均值)。在3、5和12μM核心蛋白多糖下与Crtap^{-/-}I型胶原结合的核心蛋白多糖的平均降低分别为28.5%、33.5%和38.1%。

[0246] 该发现提示胶原-蛋白多糖的相互作用的改变可能促成OI中骨和其它富含胶原组织中失调的TGFβ信号传导。基于报道的核心蛋白多糖有效降低TGFβ生物活性对核心蛋白多糖-胶原结合的要求,有可能OI胶原的缺陷导致改变的核心蛋白多糖结合,并因此,导致其将TGFβ隔离在基质中并调节TGFβ功能的能力。因此,改变的蛋白多糖-胶原相互作用可能促成OI中骨和其它富含胶原组织中失调的TGFβ信号传导,即使不存在绝对TGFβ水平的主要变

化(图24和图25)。在更严重形式的显性OI中的COL1A1和COL1A2突变聚簇于已知结合蛋白多糖的特定区域的发现支持这一观点,进一步支持蛋白多糖-胶原相互作用与正常骨稳态平衡的生理学相关性。这也将暗示,和核心蛋白多糖竞争胶原结合位点的其它蛋白多糖也可能促成失调的TGF β 活性,且额外的信号传导途径能被改变。

[0247] 由于OI一些隐性和显性形式的临床重叠(其中胶原纤维的缺陷结构导致脆骨症和骨外征象),有可能TGF β 信号传导的失调是共同的病理生理学疾病机制。为了证明该假设,研究了显性OI的小鼠模型中的TGF β 信号传导状态。在Col1a2基因中携带G610C突变的敲入小鼠(Col1a2^{tm1.1Mcbr})表型模拟显性遗传的中等形式的OI,所述OI原始在Amish人群中鉴别。在Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠的骨样品中,发现TGF β 靶基因p21和PAI-1增加的表达,表明TGF β 信号传导被上调(图13A)。一致地,来自Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠的骨提取物的免疫印迹分析也显示活化的pSmad/总Smad2的增加的比率,类似于我们在Crtap^{-/-}小鼠中的观察(图13B和13C)。

[0248] 为了测试在该显性OI模型中增加的TGF β 信号传导也代表致病机制,8周龄的Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠用TGF β -中和抗体1D11处理8周;对照Col1a2^{tm1.1Mcbr}和WT小鼠用对照抗体13C4处理。类似于在Crtap^{-/-}小鼠中的发现,1D11-处理将脊柱处的小梁骨参数恢复至WT水平(图13D、13E和22)。一并考虑,这些发现表明失调的TGF β 信号传导对于显性形式的OI的发病机制也是重要的促成因素,以及表明抗TGF β 疗法校正了显性OI中的骨表型。

[0249] 从临床-翻译角度,必须考虑OI患者中全身TGF β 抑制的潜在负面作用。尽管TGF- β 1^{-/-}小鼠在生命的最初几周发展出严重的多病灶炎症疾病和免疫系统失调,在用1D11处理的Crtap^{-/-}和Col1a2^{tm1.1Mcbr}小鼠中,我们没有观察到对一般健康、行为或生长的明显负面作用,提示在成年小鼠中对TGF β 配体的部分药理学抑制不同于在发育期间TGF β 1的完全缺失。在人中,夫苏木单抗(GC1008, Genzyme),其对TGF β 三种同种型的亲和力和特异性类似于1D11,被用于患者中的I期研究,所述患者具有治疗抗性原发灶节段性肾小球硬化、特发性肺纤维化和恶性黑色素瘤或肾细胞癌。在这些研究中,夫苏木单抗大体上是良好耐受的,可能具有剂量相关副作用包括皮疹或斑、鼻出血、牙龈出血和疲劳。

[0250] OI的分子机制并没有完全了解。因此,当前对患有OI的患者的治疗选择主要限于抗吸收疗法,如用于治疗骨质疏松症。有趣的是,最近的合成代谢剂特立帕肽在OI成人中的随机化、安慰剂对照试验显示III/IV型严重OI与具有I型温和OI的那些反应不同(Orwoll等,2014)。这提示对靶向修饰细胞信号传导的疗法应答的基因型差异,以及TGF β -靶向治疗可能是在由于胶原和胶原翻译后修饰基因突变造成的严重OI中进一步研究的有希望的选择。总体上,我们的数据支持失调的基质细胞信号传导为脆骨病不同遗传学遗传形式的发病机制的概念,并指出基于疾病特异性机制,通过中和骨骼和骨外组织的过度活性的TGF β 来治疗OI的策略。

序列表

<110> 建新公司
贝勒医学院

<120>用于治疗成骨不全的方法

<130> 554897 SA9-108W0

<140>

<141>

<150> 61/883, 151

<151> 2013-10-26

<150> 61/875, 399

<151> 2013-09-09

<150> 61/803, 647

<151> 2013-03-20

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 390

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

[0001]

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
20 25 30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
35 40 45

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

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
85 90 95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
100 105 110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
115 120 125

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
130 135 140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
145 150 155 160

Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn

	165	170	175
	Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser 180 185 190		
	Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu 195 200 205		
	Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser 210 215 220		
	Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr 225 230 235 240		
	Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro 245 250 255		
	Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln 260 265 270		
	Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser 275 280 285		
	Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys 290 295 300		
[0002]	Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn 305 310 315 320		
	Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr 325 330 335		
	Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala 340 345 350		
	Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr 355 360 365		
	Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val 370 375 380		
	Arg Ser Cys Lys Cys Ser 385 390		
	<210> 2 <211> 414 <212> PRT <213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 2 Met His Tyr Cys Val Leu Ser Ala Phe Leu Ile Leu His Leu Val Thr 1 5 10 15		
	Val Ala Leu Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe 20 25 30		

Met Arg Lys Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 35 40 45
 Lys Leu Thr Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro
 50 55 60
 Pro Glu Val Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu
 65 70 75 80
 Lys Ala Ser Arg Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu
 85 90 95
 Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe
 100 105 110
 Pro Ser Glu Asn Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg
 115 120 125
 Ile Val Arg Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu
 130 135 140
 Val Lys Ala Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg
 145 150 155 160
 Val Pro Glu Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp
 165 170 175
 Leu Thr Ser Pro Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr
 180 185 190
 Arg Ala Glu Gly Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His
 195 200 205
 Glu Trp Leu His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu
 210 215 220
 His Cys Pro Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro
 225 230 235 240
 Asn Lys Ser Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys
 260 265 270
 Lys Asn Ser Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser
 275 280 285
 Tyr Arg Leu Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu
 290 295 300
 Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg
 305 310 315 320

[0003]

Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His
325 330 335

Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr
340 345 350

Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn
355 360 365

Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp
370 375 380

Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile
385 390 395 400

Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
405 410

<210> 3

<211> 412

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

Met Lys Met His Leu Gln Arg Ala Leu Val Val Leu Ala Leu Leu Asn
1 5 10 15

[0004]

Phe Ala Thr Val Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe
20 25 30

Gly His Ile Lys Lys Lys Arg Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu
35 40 45

Ser Lys Leu Arg Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His
50 55 60

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

Glu Glu Met His Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr
85 90 95

Glu Ser Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln
100 105 110

Gly Leu Ala Glu His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr
115 120 125

Ser Lys Val Phe Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr
130 135 140

Asn Leu Phe Arg Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser
145 150 155 160

Ser Lys Arg Asn Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro

	165	170	175
	Asp Glu His Ile Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro 180	185	190
	Thr Arg Gly Thr Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val 195	200	205
	Arg Glu Trp Leu Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser 210	215	220
	Ile His Cys Pro Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu 225	230	235
	Asn Ile His Glu Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu 245	250	255
	Asp Asp His Gly Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp 260	265	270
	His His Asn Pro His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu 275	280	285
	Asp Asn Pro Gly Gln Gly Gly Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr 290	295	300
[0005]	Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu 305	310	315
	Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro 325	330	335
	Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg 340	345	350
	Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu 355	360	365
	Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu 370	375	380
	Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln 385	390	395
	Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser 405	410	
	<210> 4		
	<211> 5		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="对人工序列的描述：合成肽"		

<400> 4
Ser Asn Val Ile Ser
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成肽"

<400> 5
Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成肽"

[0006] <400> 6
Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成肽"

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成肽"

<400> 8
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro
1 5

<210> 9
<211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="对人工序列的描述: 合成肽"

 <400> 9
 Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr
 1 5

 <210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="对人工序列的描述: 合成多肽"

 <400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

 Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 [0007] Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="对人工序列的描述: 合成多肽"

 <400> 11
 Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

	20	25	30
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45		
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80		
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro 85 90 95		
	Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys 100 105		
	<210> 12 <211> 327 <212> PRT <213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 12 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 1 5 10 15		
[0008]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30		
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45		
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr 65 70 75 80		
	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95		
	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro 100 105 110		
	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 115 120 125		
	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 130 135 140		
	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 145 150 155 160		
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 165 170 175		

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

[0009]

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 13
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

	100	105
	<210> 14 <211> 447 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"	
	<400> 14 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn 20 25 30	
	Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	
	Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe 50 55 60	
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr 65 70 75 80	
[0010]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	
	Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110	
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115 120 125	
	Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala 130 135 140	
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 145 150 155 160	
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val 165 170 175	
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro 180 185 190	
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys 195 200 205	
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro 210 215 220	
	Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val 225 230 235 240	

[0011]

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 15
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="对人工序列的描述：合成
 多肽"
 <400> 15
 Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser
 20 25 30

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

[0012]

<210> 16
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="对人工序列的描述：合成肽"
 <400> 16
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

<210> 17
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"
 <400> 17
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

[0013]

	260	265	270
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu 275 280 285		
	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 290 295 300		
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg 305 310 315 320		
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 325 330 335		
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu 340 345 350		
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 355 360 365		
	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 370 375 380		
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 385 390 395 400		
[0014]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 405 410 415		
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp 420 425 430		
	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 435 440 445		
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu 450 455 460		
	Gly Lys 465		
	<210> 18 <211> 234 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <221> 来源 <223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"		
	<400> 18 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15		
	Val His Ser Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu 20 25 30		

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

[0015]

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 鼠(Mus sp.)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> 羟基化的 Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> 3-羟基化的 Pro

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (13)..(13)
<223> 羟基化的 Pro

<400> 19
Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 鼠(Mus sp.)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 羟基化的 Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 羟基化的 Pro

[0016]

<400> 20
Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
1 5 10 15

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 鼠(Mus sp.)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 羟基化的 Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 羟基化的 Pro

<400> 21
Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
1 5 10 15

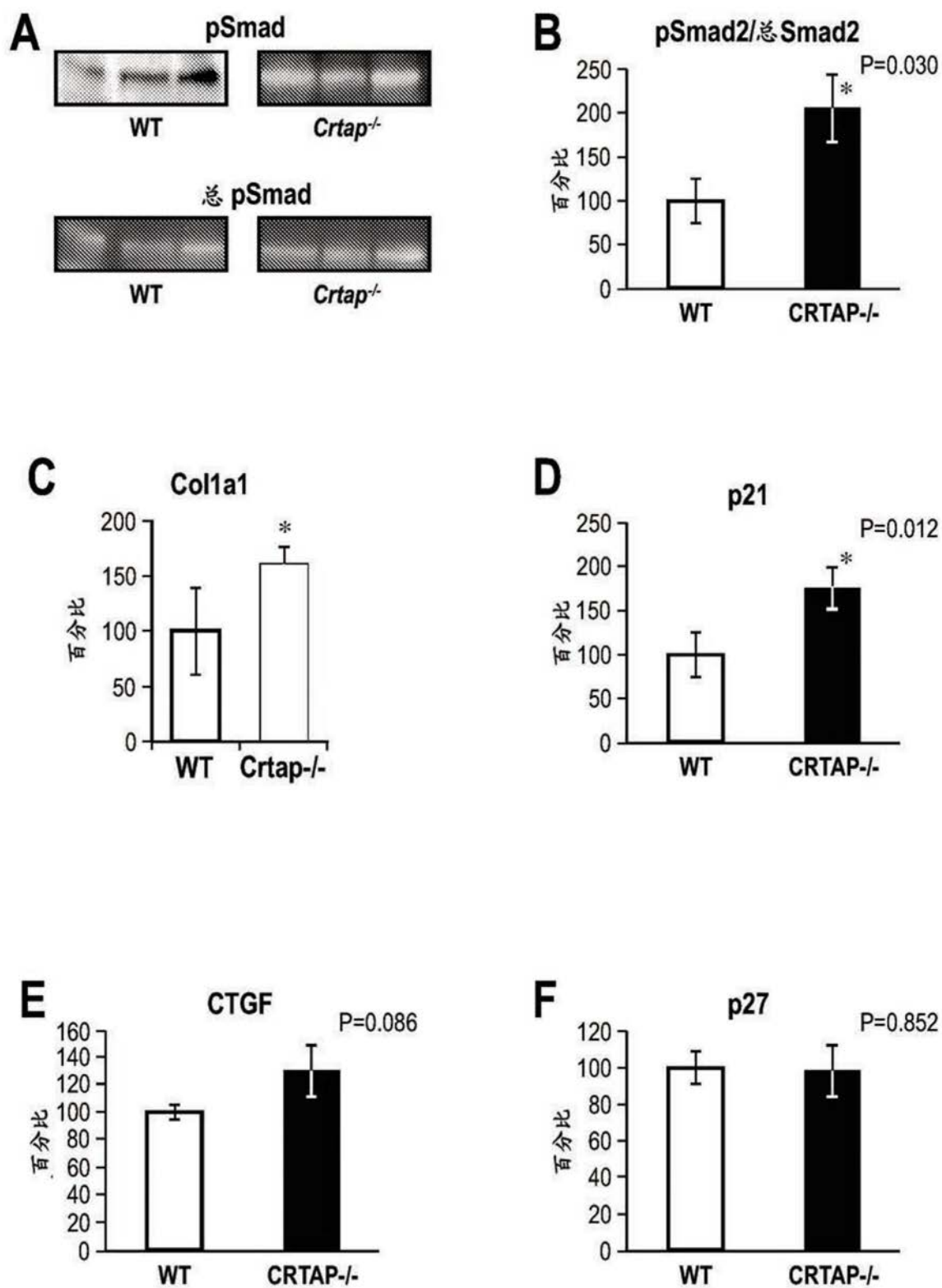


图1

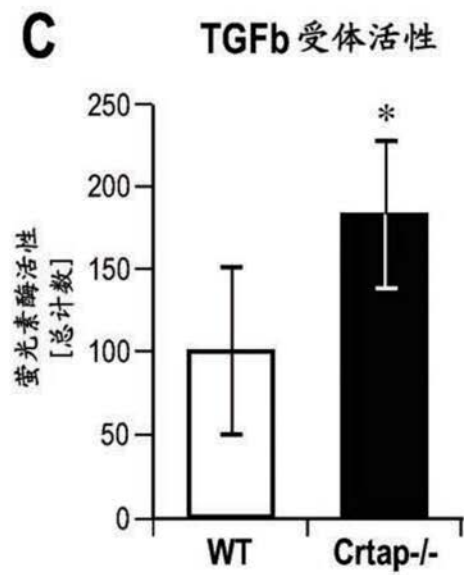
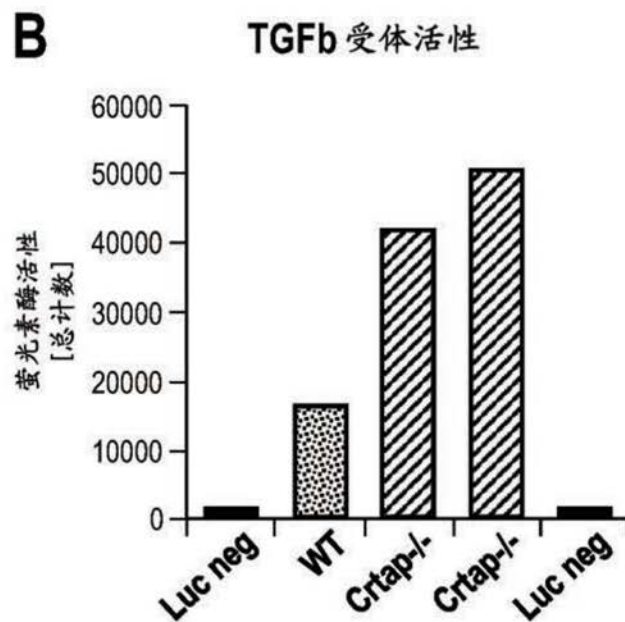
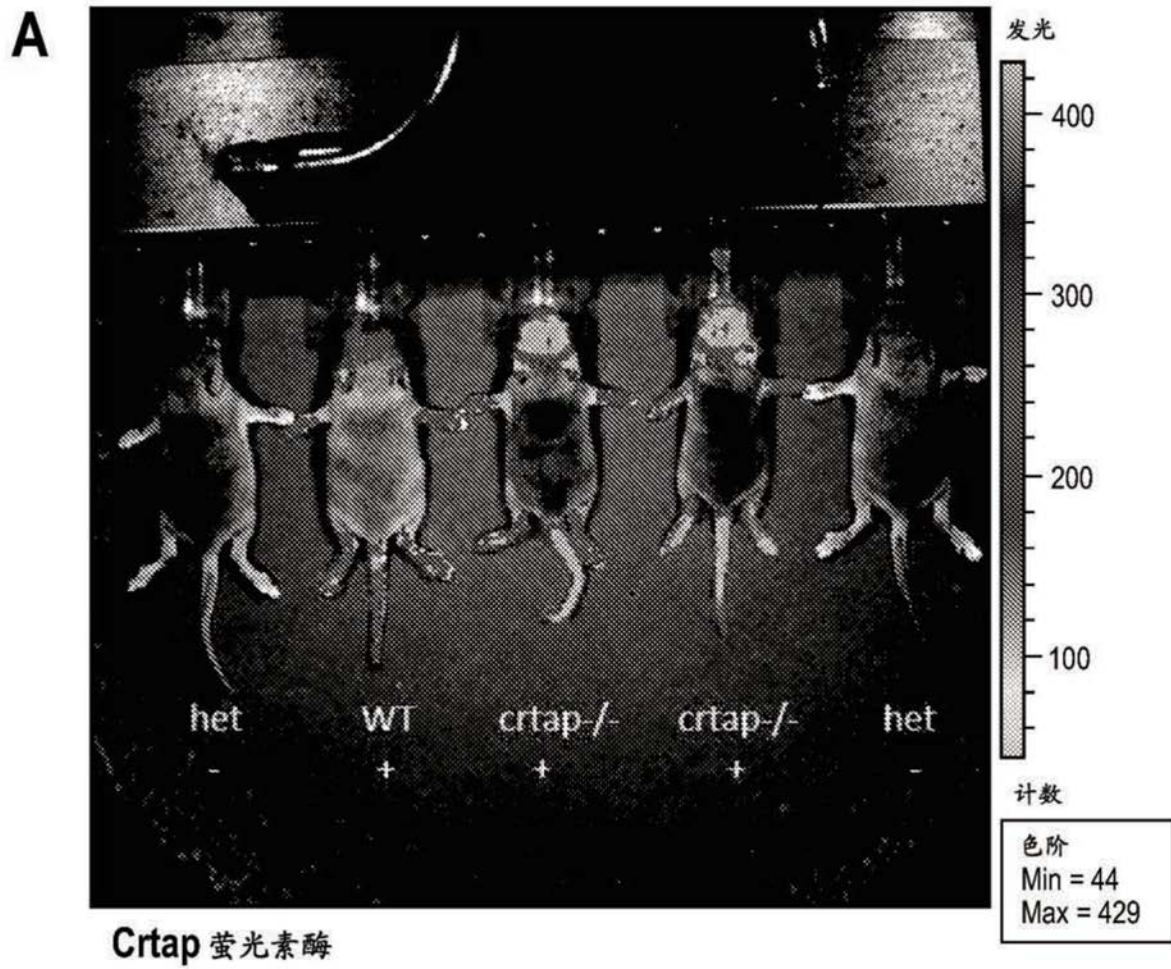


图2

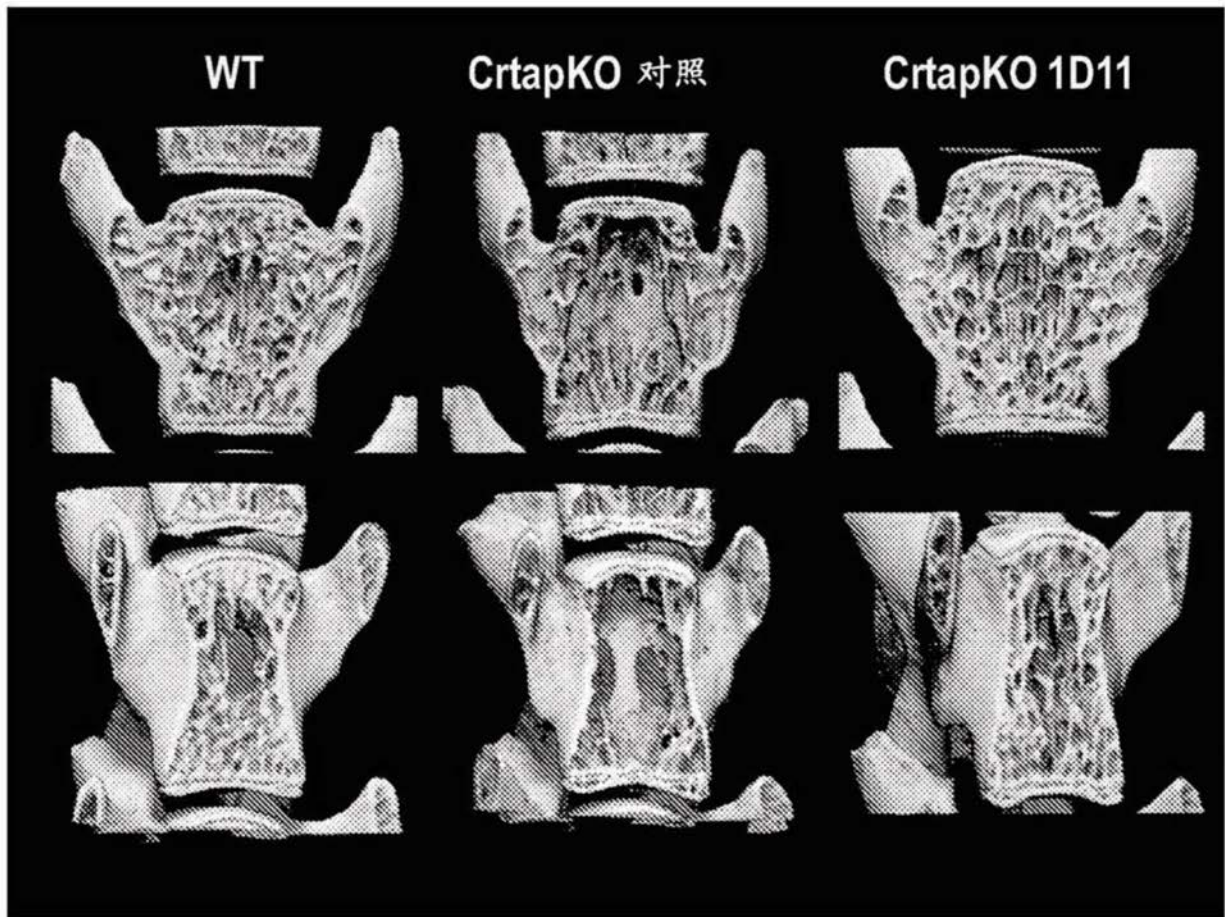
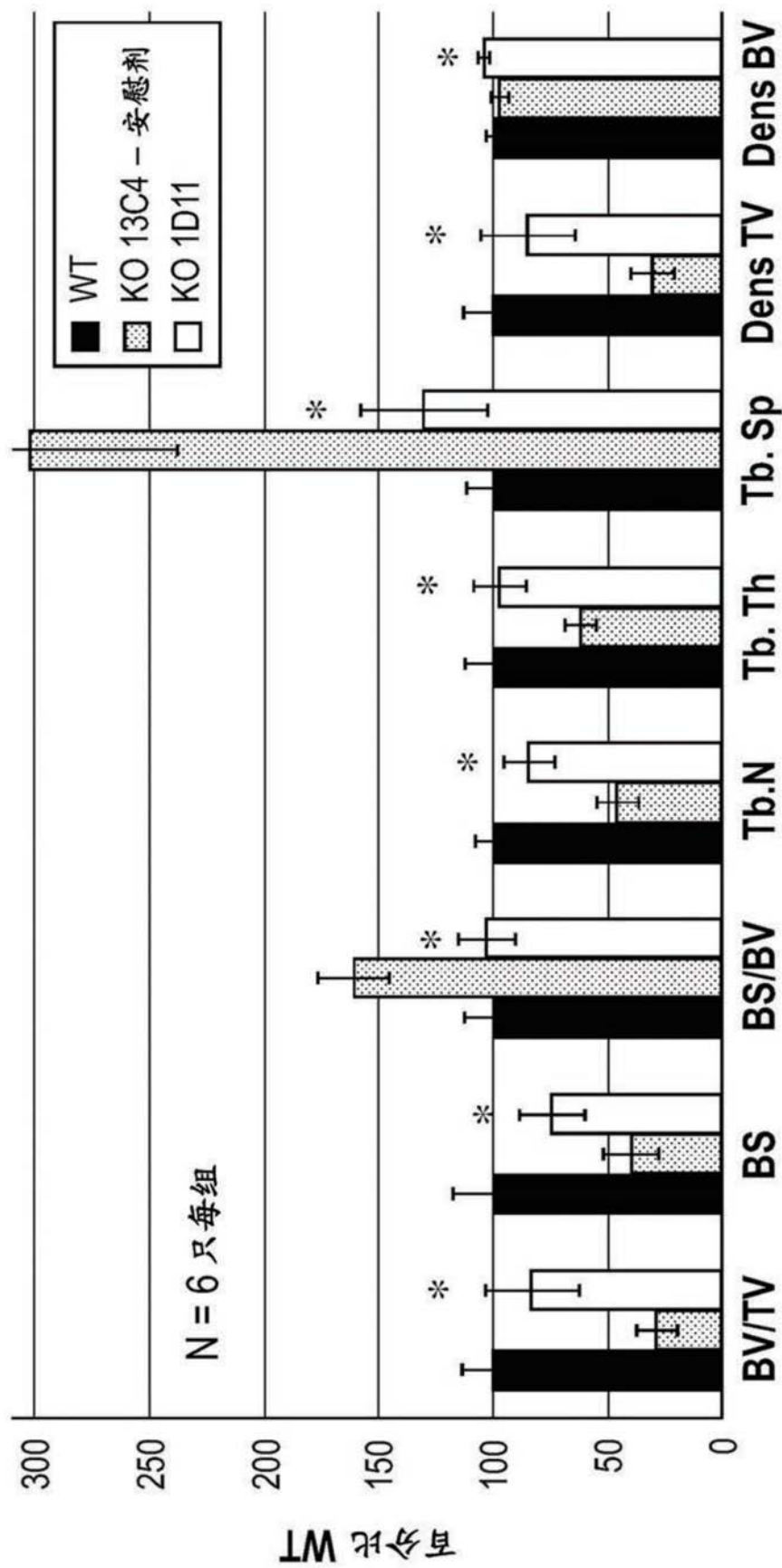
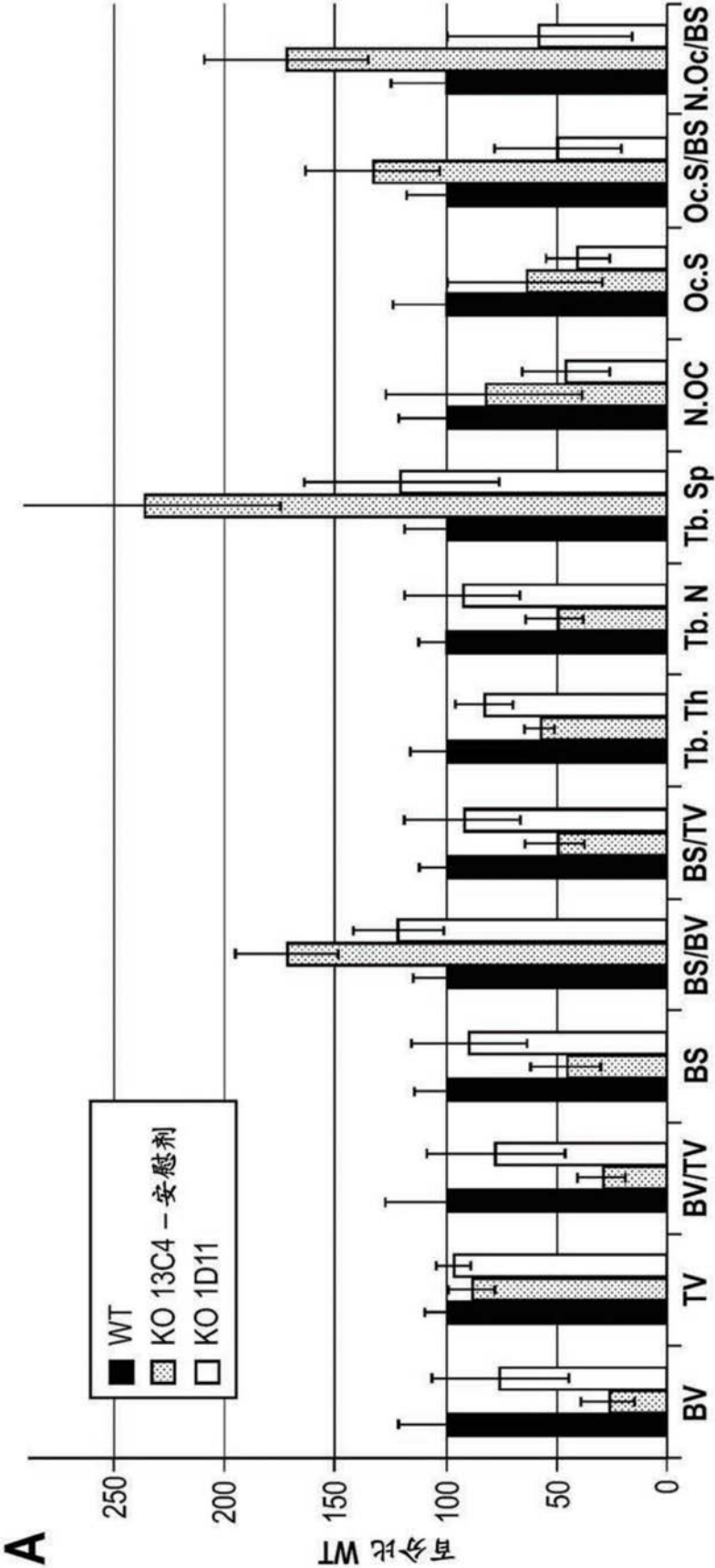


图3



第16周 (治疗的, 第8-16周)

图4



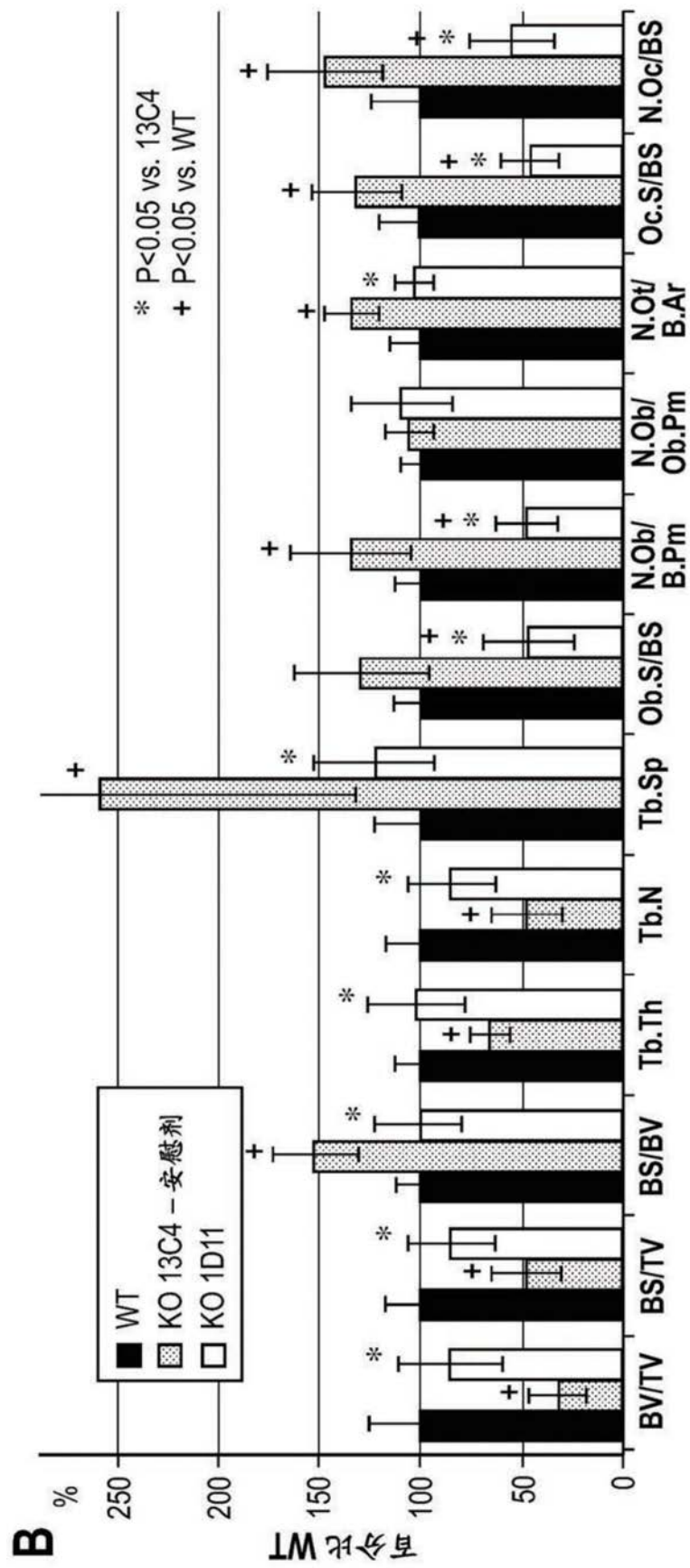


图5

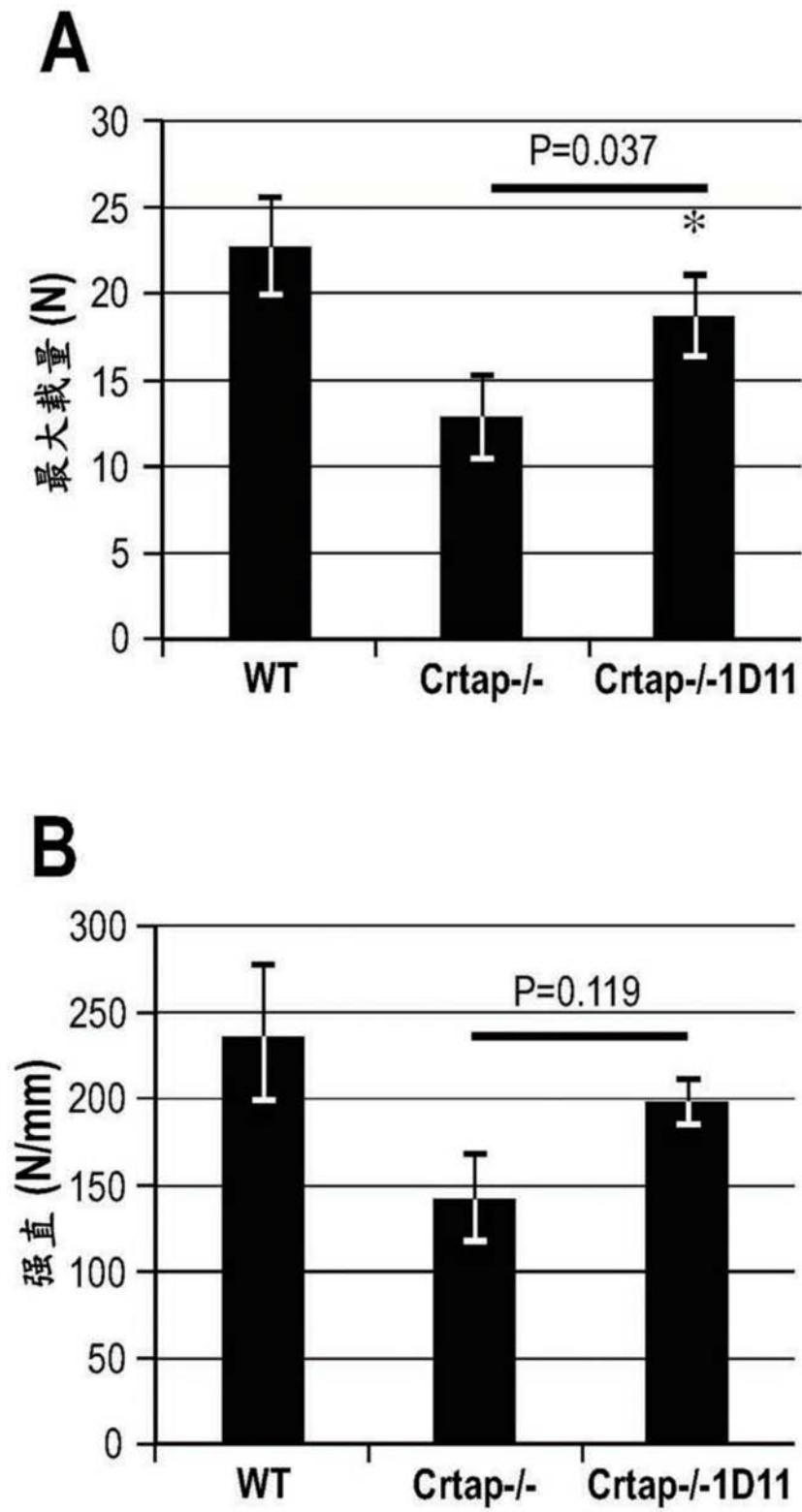


图6

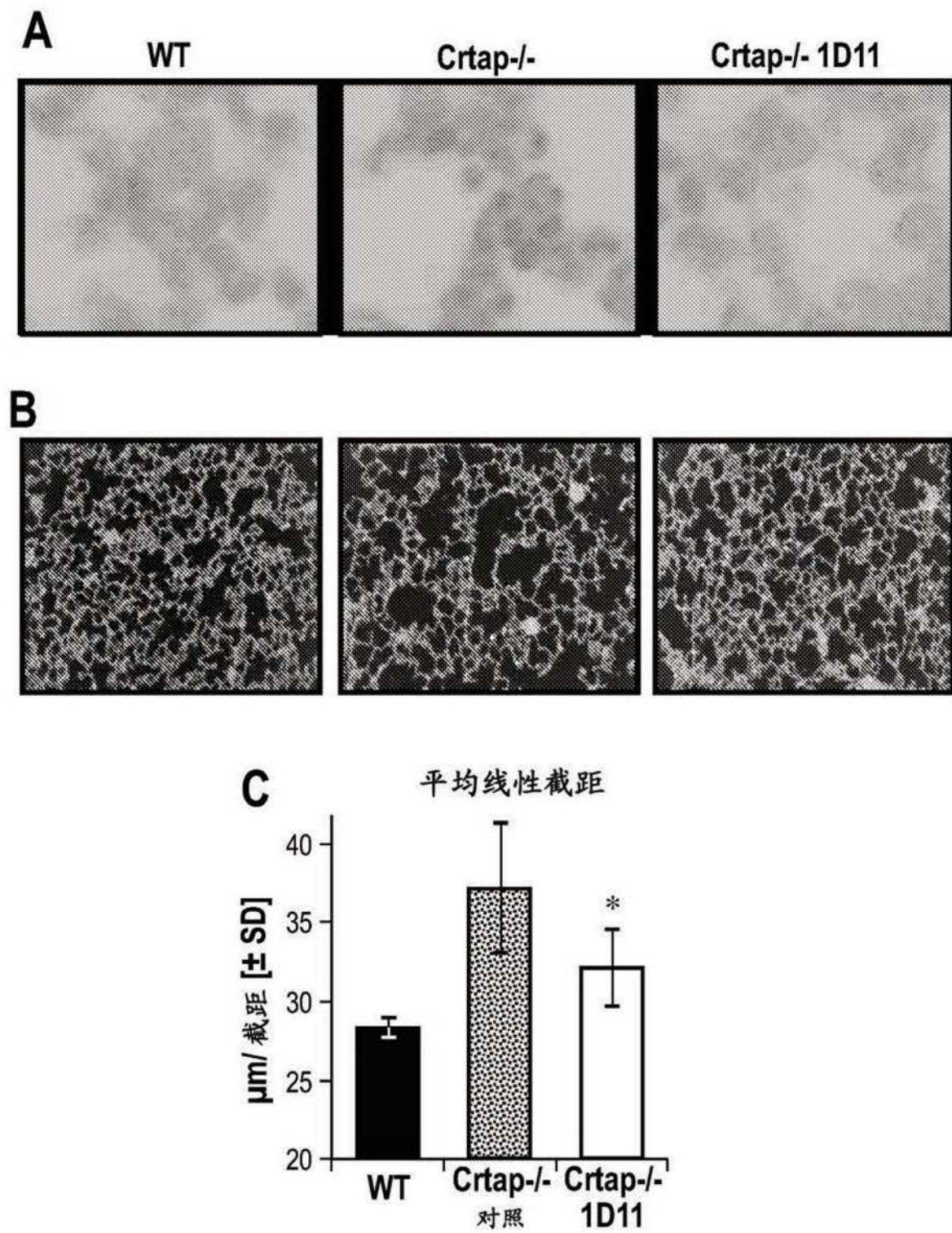


图7

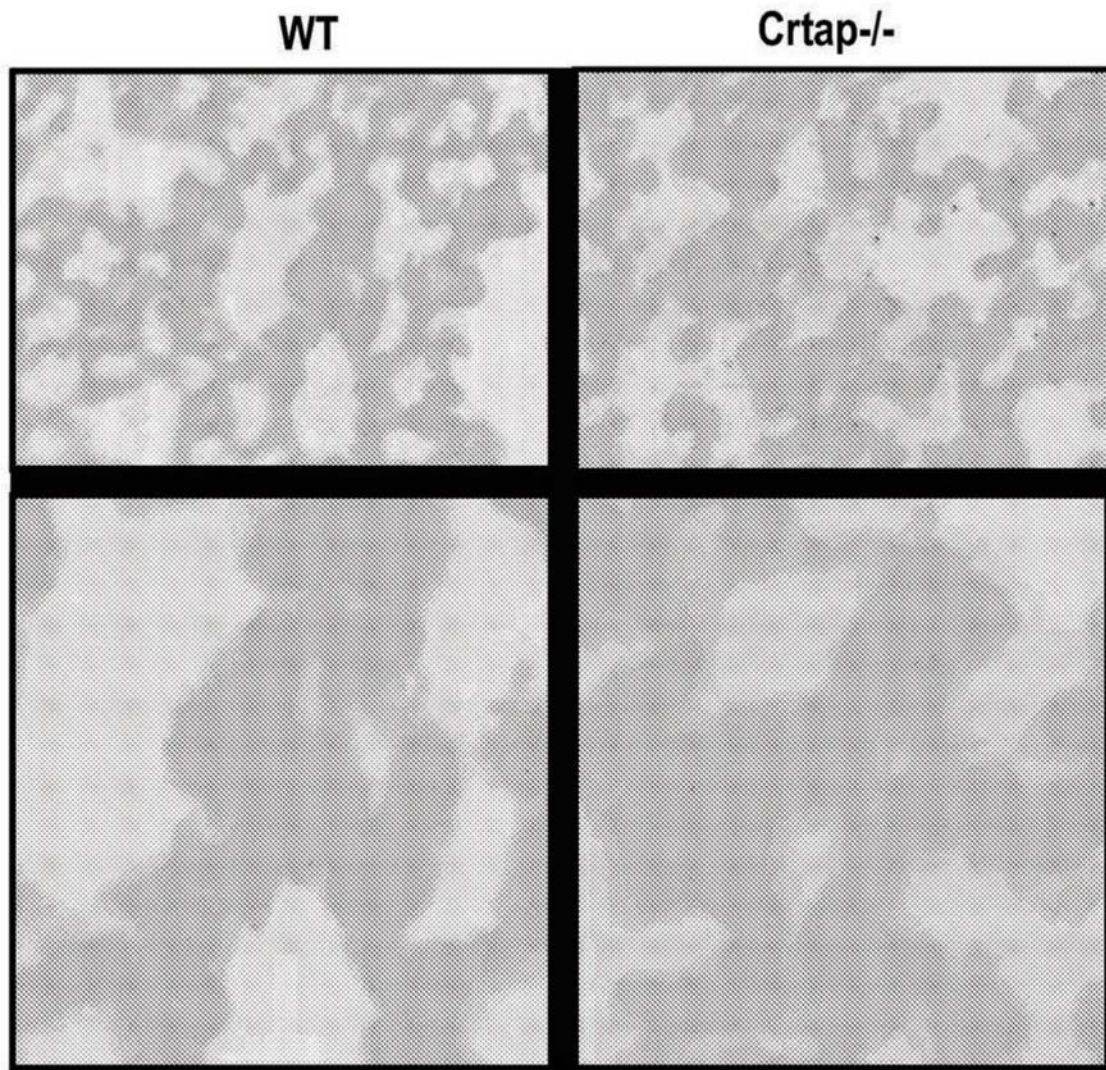


图8

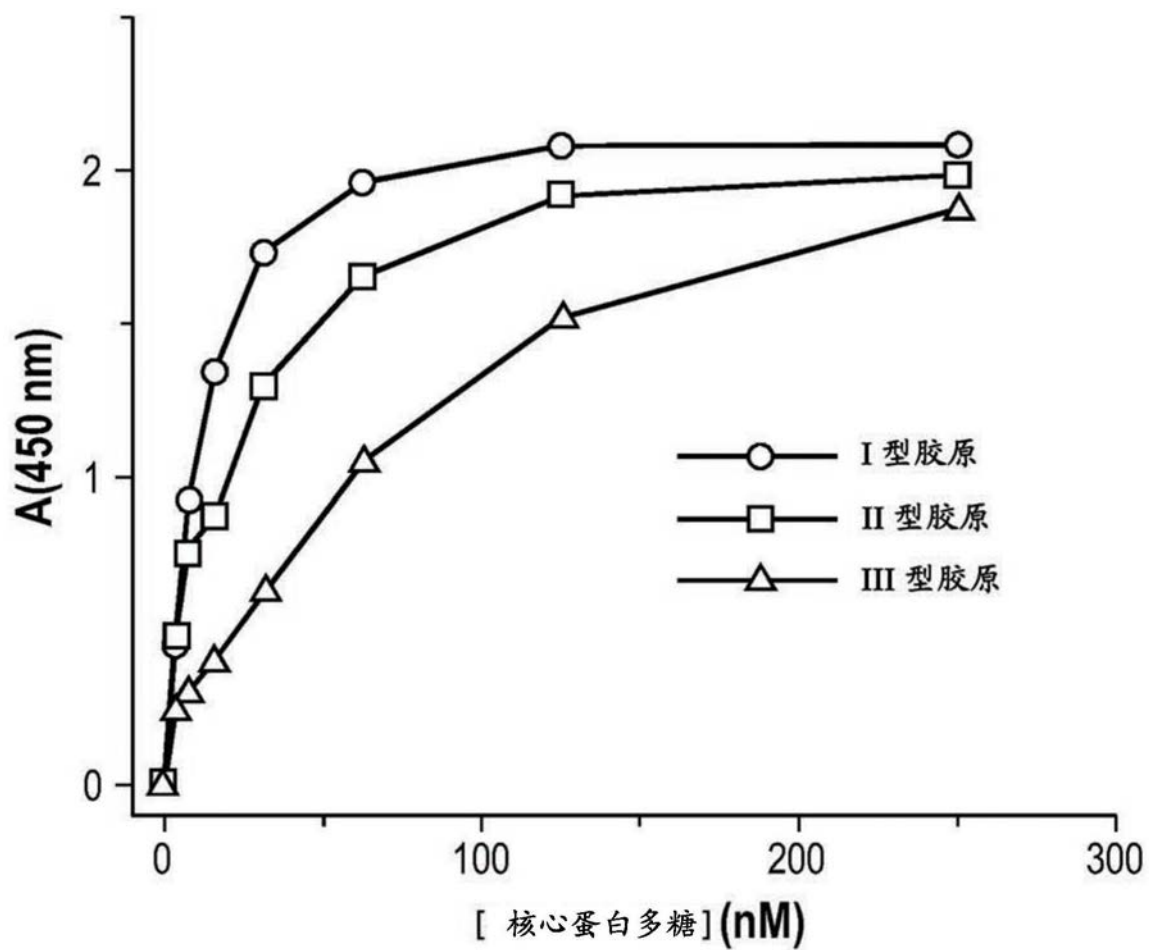


图9

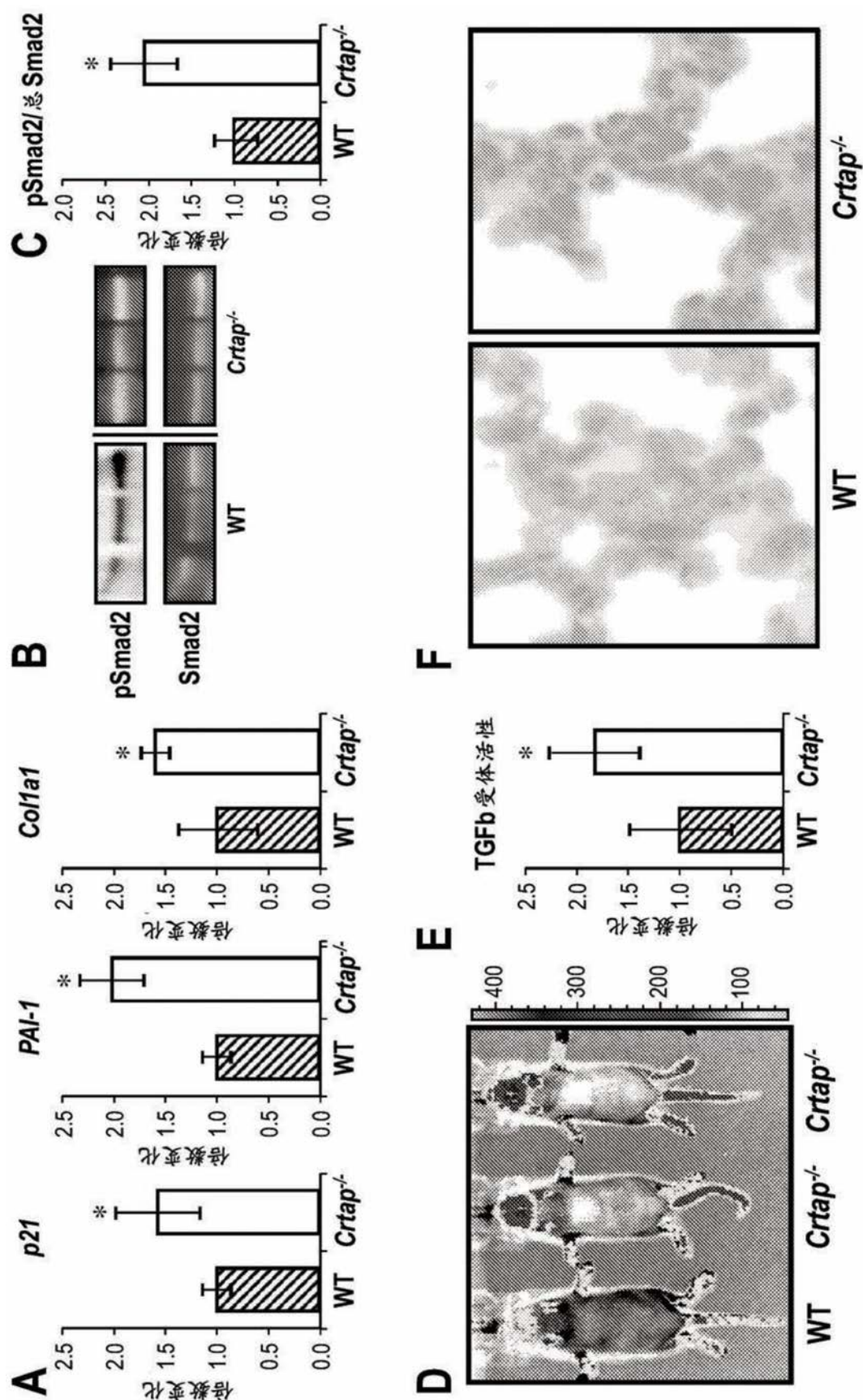


图10

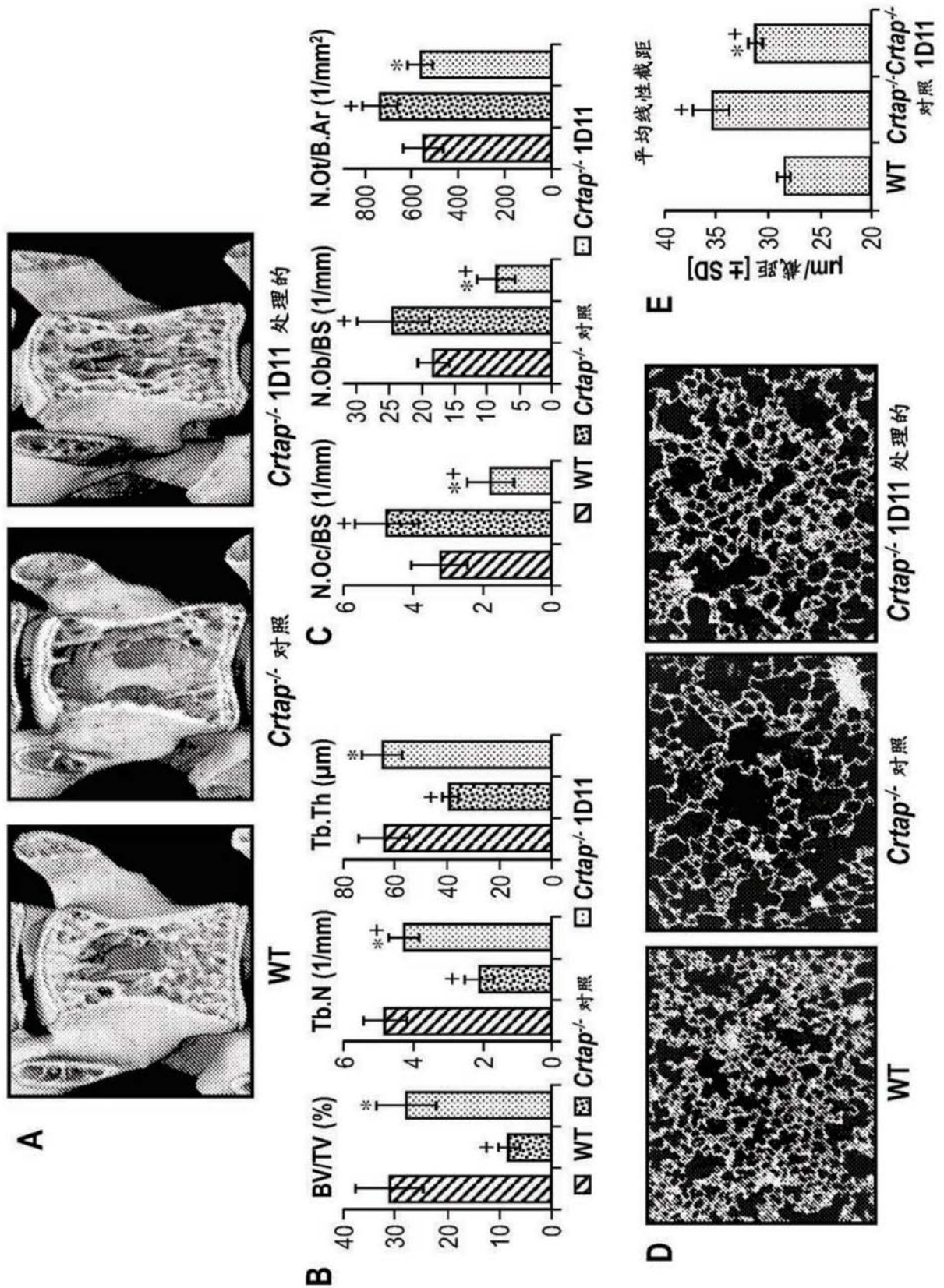


图11

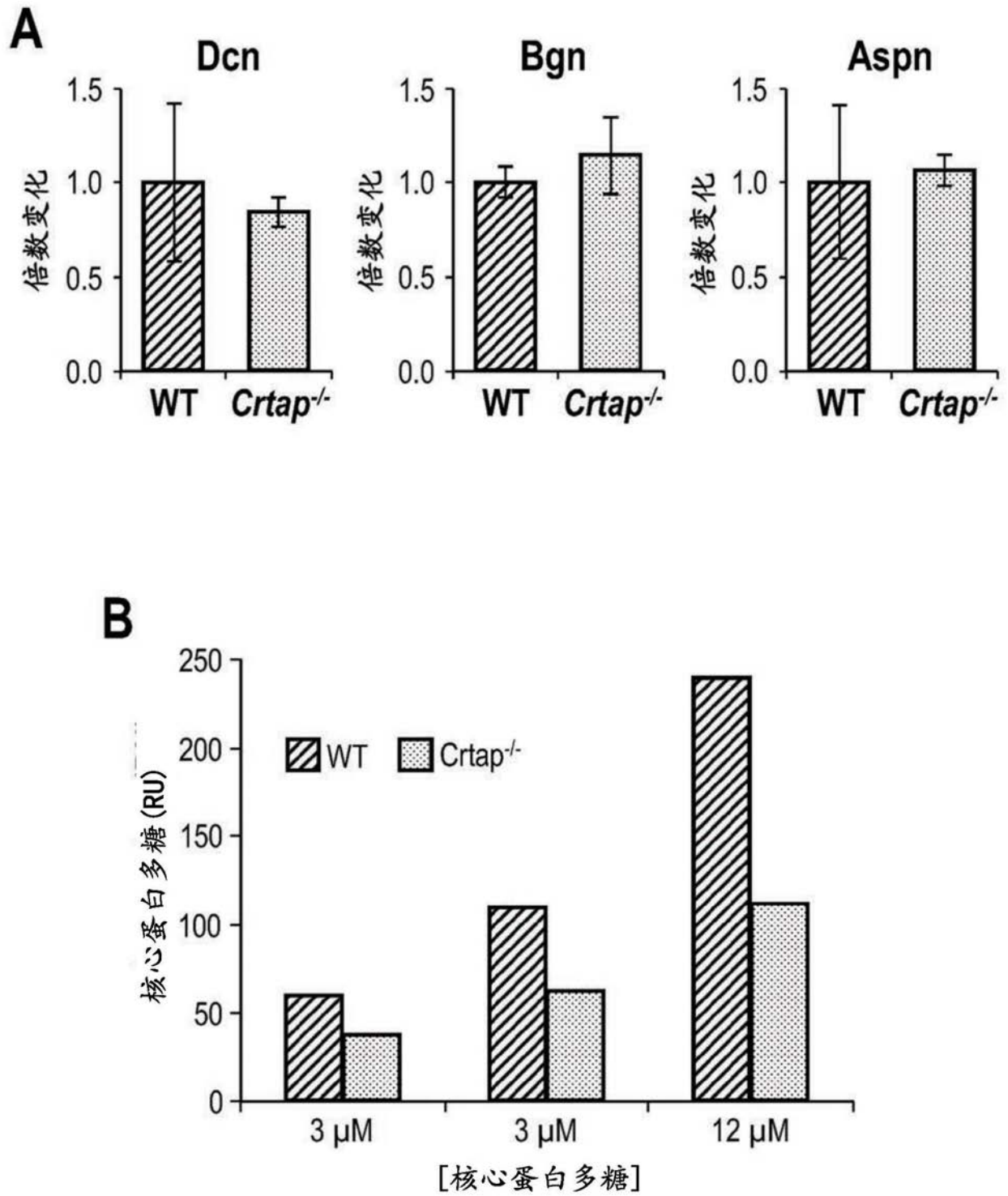


图12

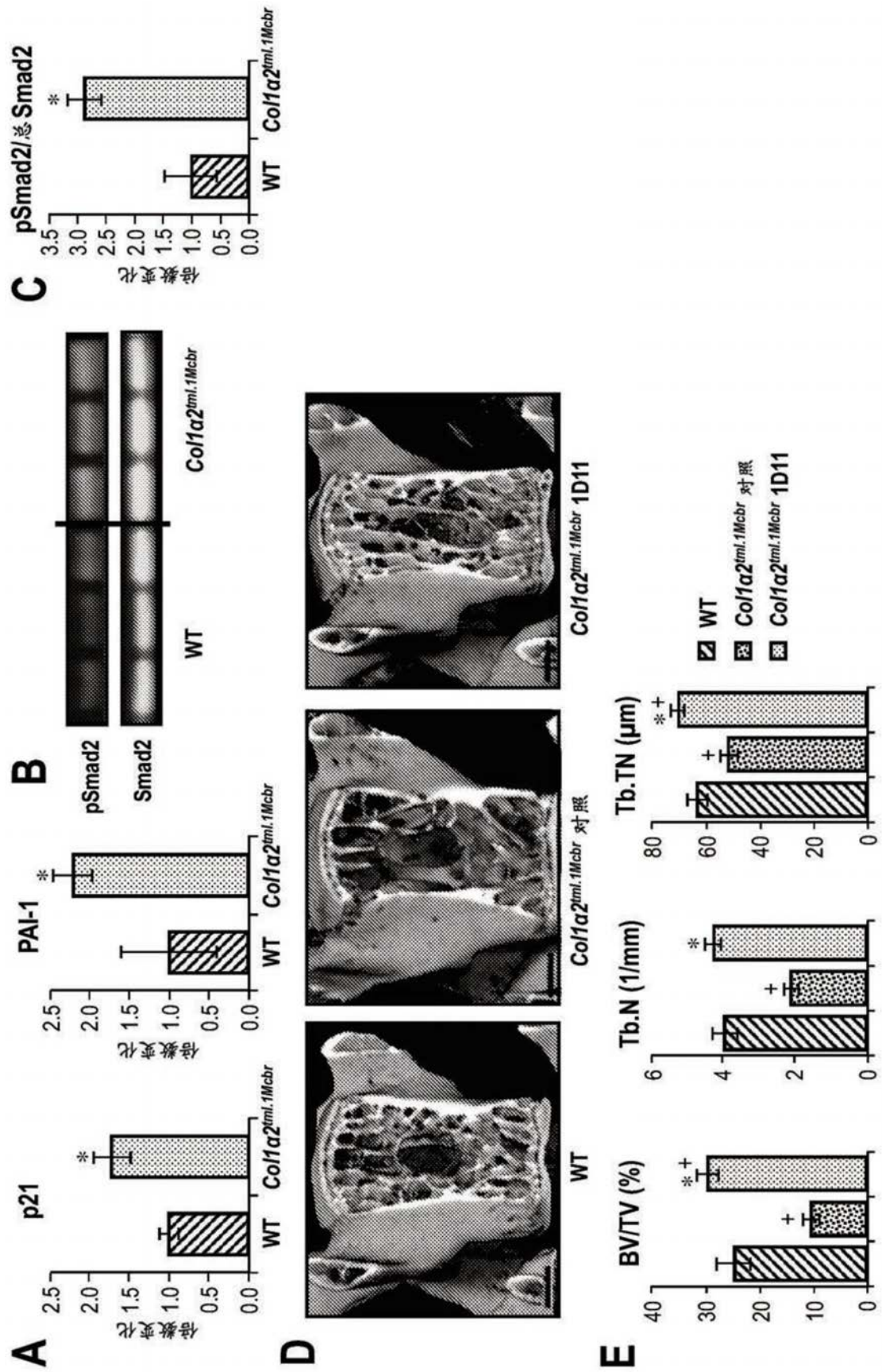


图13

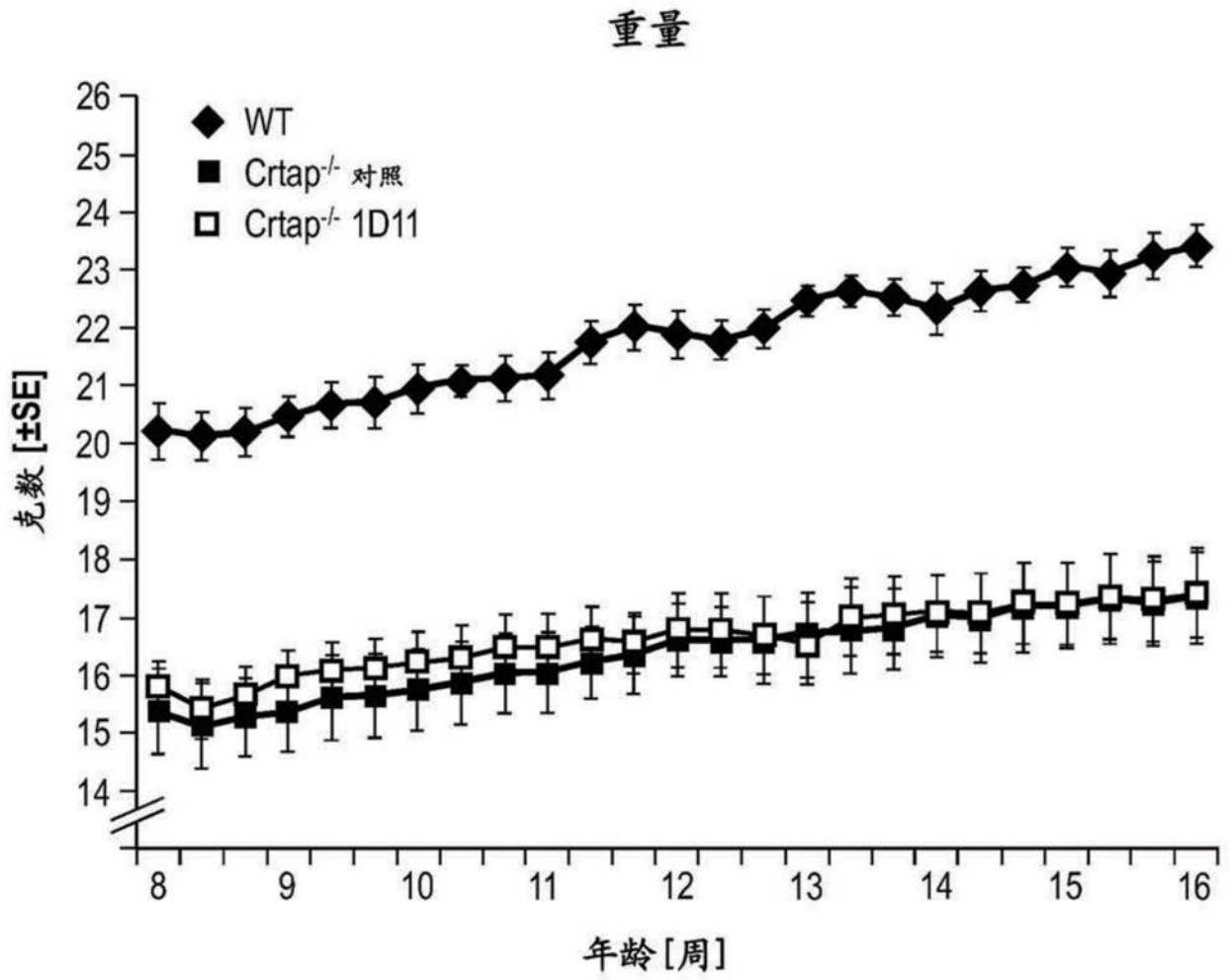


图14

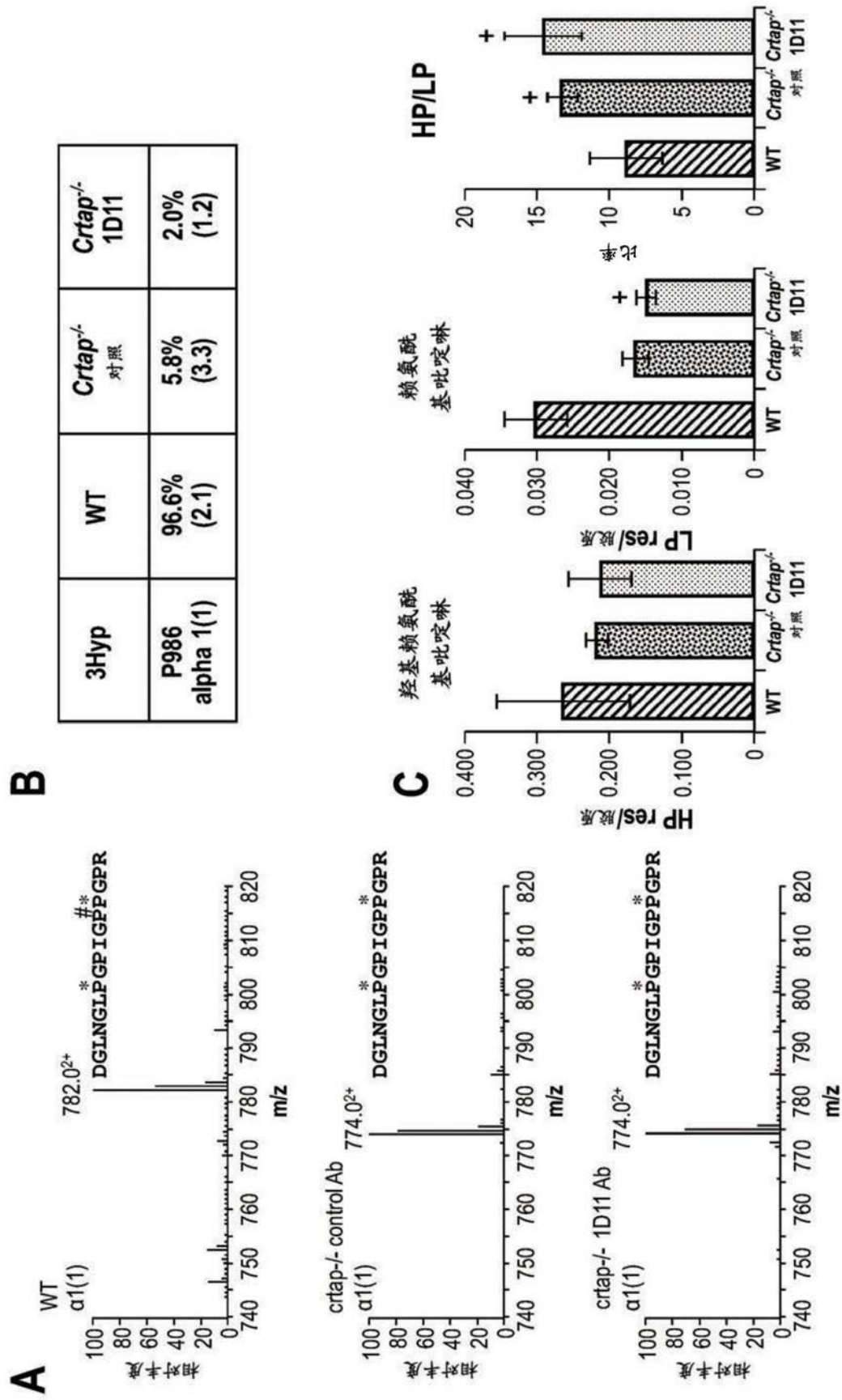


图15

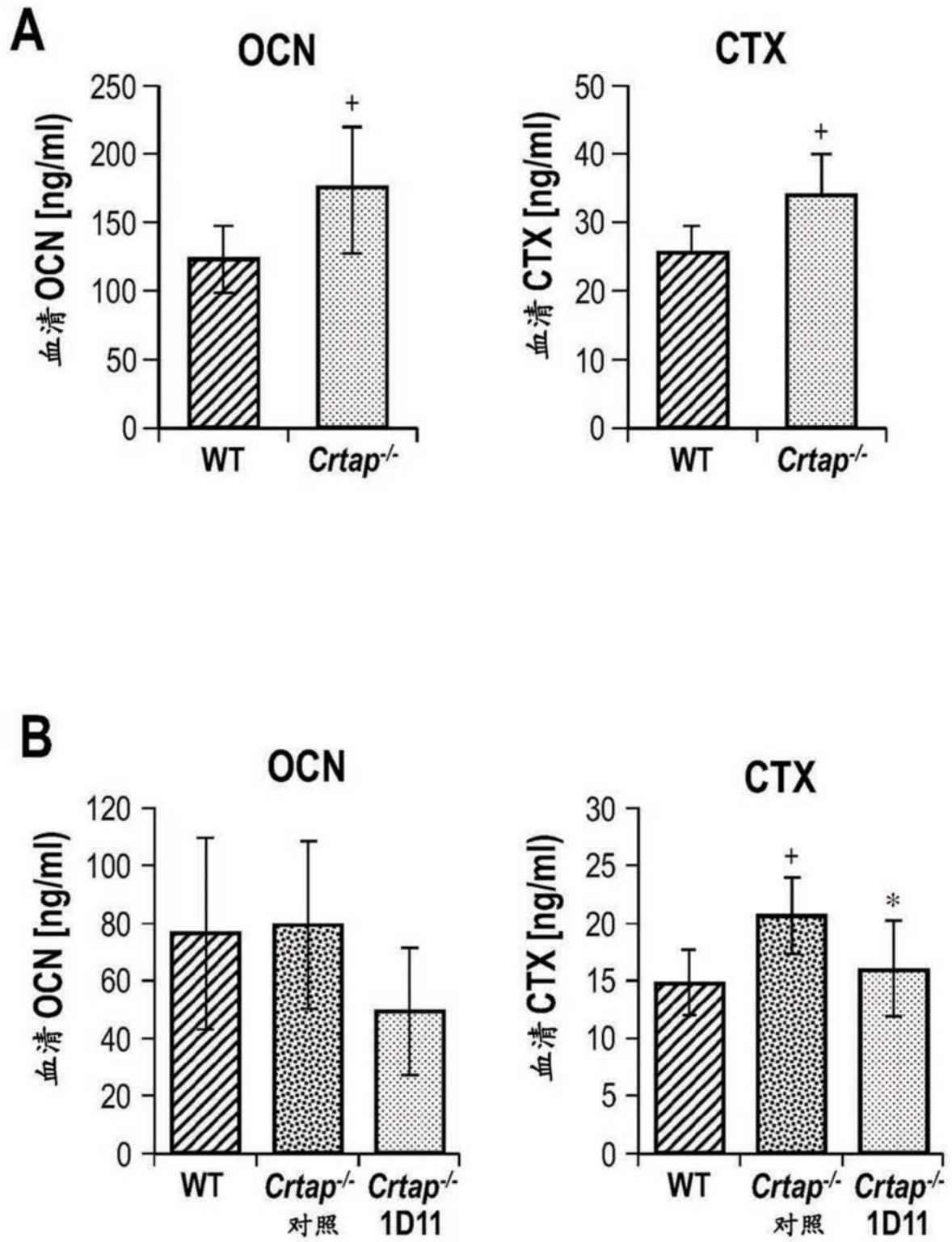


图16

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)
野生型	0.312	4.845	63.988	0.145	703.189
SD	0.065	0.583	9.482	0.034	19.014
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	0.084	2.130	38.888	0.450	677.416
SD	0.020	0.409	2.931	0.118	16.138
<i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	0.280	4.290	64.650	0.171	746.862
SD	0.056	0.435	7.407	0.030	26.564
ANOVA P 值	<0.001	<0.001	<0.001 ⁺	<0.001 ⁺	<0.001
配对 P 值					
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	0.023
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	0.031	n.s.	n.s.	<0.001
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.001

图17

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)
野生型	0.107	2.808	37.413	0.341	733.864
SD	0.036	0.684	5.071	0.108	25.997
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	0.029	0.861	32.863	1.209	727.151
SD	0.011	0.237	3.428	0.345	28.765
<i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	0.123	2.953	40.663	0.323	756.539
SD	0.045	0.767	5.842	0.121	36.913
ANOVA P 值	<0.001 ⁺	<0.001 ⁺	0.015	<0.001	0.162
配对 P 值					
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	<0.05	<0.05	n.s.	<0.001	
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	<0.05	<0.05	0.004	<0.001	

图18

	皮层厚度 (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)	直径 a.p. (mm)	CSA (mm ²)	CSMI m.l. (mm ⁴)	CSMI a.p. (mm ⁴)
野生型	0.242	1084.726	1.239	0.905	0.134	0.221
SD	0.014	28.375	0.063	0.079	0.023	0.042
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	0.203	1084.885	1.142	0.731	0.101	0.162
SD	0.020	34.256	0.065	0.082	0.021	0.034
<i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	0.221	1096.127	1.186	0.808	0.111	0.186
SD	0.026	39.754	0.080	0.118	0.028	0.038
ANOVA P 值	0.003	0.753	0.039	0.005	0.032	0.021
配对 P 值						
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	<0.001		0.012	0.001	0.011	0.006
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

图19

	最大载量	强直	达到失灵的 能量	极限强度	达到 失灵的 韧性	弹性模量	总位移	弹性位移	后屈服位移
	(N)	(N/mm)	(N*mm)	(MPa)	(MPa)	(GPa)	(mm)	(mm)	(mm)
野生型	22.831	230.578	7.846	154.704	11.912	6.960	0.444	0.068	0.376
SD	2.860	37.053	3.985	7.478	5.695	0.731	0.207	0.014	0.203
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	12.943	151.689	1.228	114.496	2.208	6.663	0.127	0.079	0.048
SD	2.402	27.384	0.913	18.240	1.677	1.154	0.057	0.006	0.058
<i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	18.818	200.804	1.991	145.633	3.408	7.248	0.156	0.073	0.083
SD	2.337	15.644	0.834	19.074	1.851	0.271	0.055	0.013	0.055
ANOVA P 值	<0.001	0.009	0.009	0.004	0.009	0.658	0.015	0.360	0.012
配对 P 值									
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	<0.001	0.003	0.005	0.001	0.005		0.009		0.007
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	n.s.	0.017	n.s.	0.017		0.023		0.019
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	0.015	n.s.	n.s.	0.016	n.s.		n.s.		n.s.

图20

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (μ m)	N.Oc/BS (1/mm)	Oc.S/BS (%)	N.Ob/BS (1/mm)	Ob.S/BS (%)	N.Ot/BS.Ar (1/mm ²)
野生型	11.956	4.003	29.554	226.736	3.226	15.051	18.142	20.827	549.002
SD	3.067	0.656	3.536	50.077	0.812	3.089	2.368	2.754	83.665
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	3.817	1.909	19.502	587.008	4.768	19.885	24.487	26.888	735.561
SD	1.656	0.692	2.560	289.835	0.914	3.407	5.421	6.983	72.617
<i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	10.203	3.411	30.182	277.886	1.772	6.829	8.638	9.748	565.044
SD	3.097	0.878	6.982	69.118	0.673	2.235	2.855	4.718	51.014
ANOVA P 值	<0.001	<0.001	0.002	0.003 ⁺	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
配对 P 值									
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 对照	<0.001	<0.001	0.002	<0.05	0.005	0.012	0.011	n.s.	<0.001
野生型 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.007	<0.001	<0.001	0.002	n.s.
<i>Crtap</i> ^{-/-} 对照 vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	<0.001	0.003	0.001	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

图21

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)
野生型	0.247	3.939	62.533	0.193	716.669
SD	0.033	0.330	3.497	0.025	7.626
Col1 α 2 ^{tm1.1Mcb} 对照	0.106	2.071	51.067	0.435	731.436
SD	0.015	0.195	2.999	0.047	11.792
Col1 α 2 ^{tm1.1Mcb} 1D11	0.297	4.244	69.983	0.166	754.115
SD	0.020	0.199	2.329	0.013	7.844
ANOVA P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
配对 P 值					
野生型 vs. Col1 α 2 ^{tm1.1Mcb} 对照	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.015
野生型 vs. Col1 α 2 ^{tm1.1Mcb} 1D11	0.002	n.s.	<0.001	n.s.	<0.001
Col1 α 2 ^{tm1.1Mcb} 对照 vs. Col1 α 2 ^{tm1.1Mcb} 1D11	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

图22

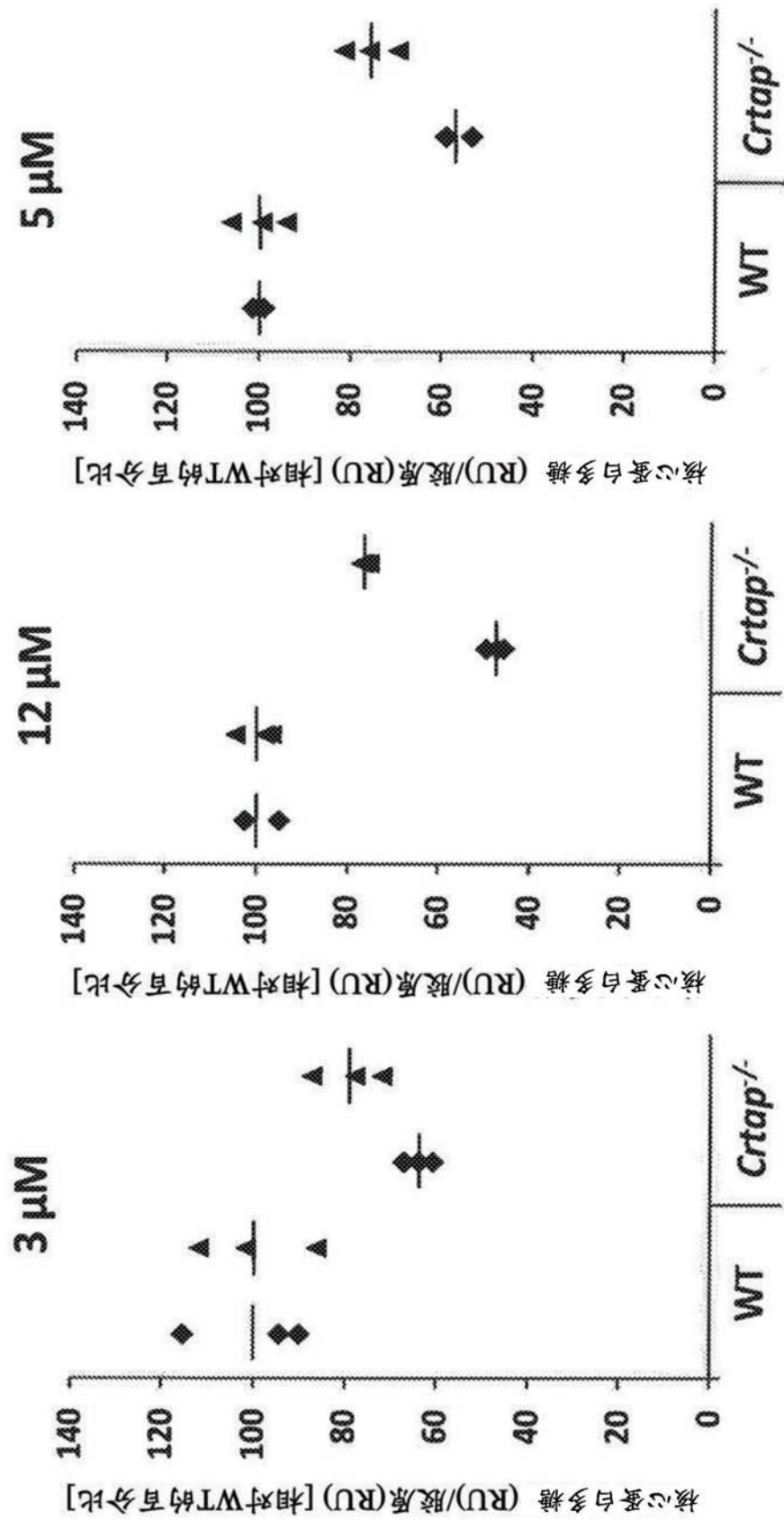


图23

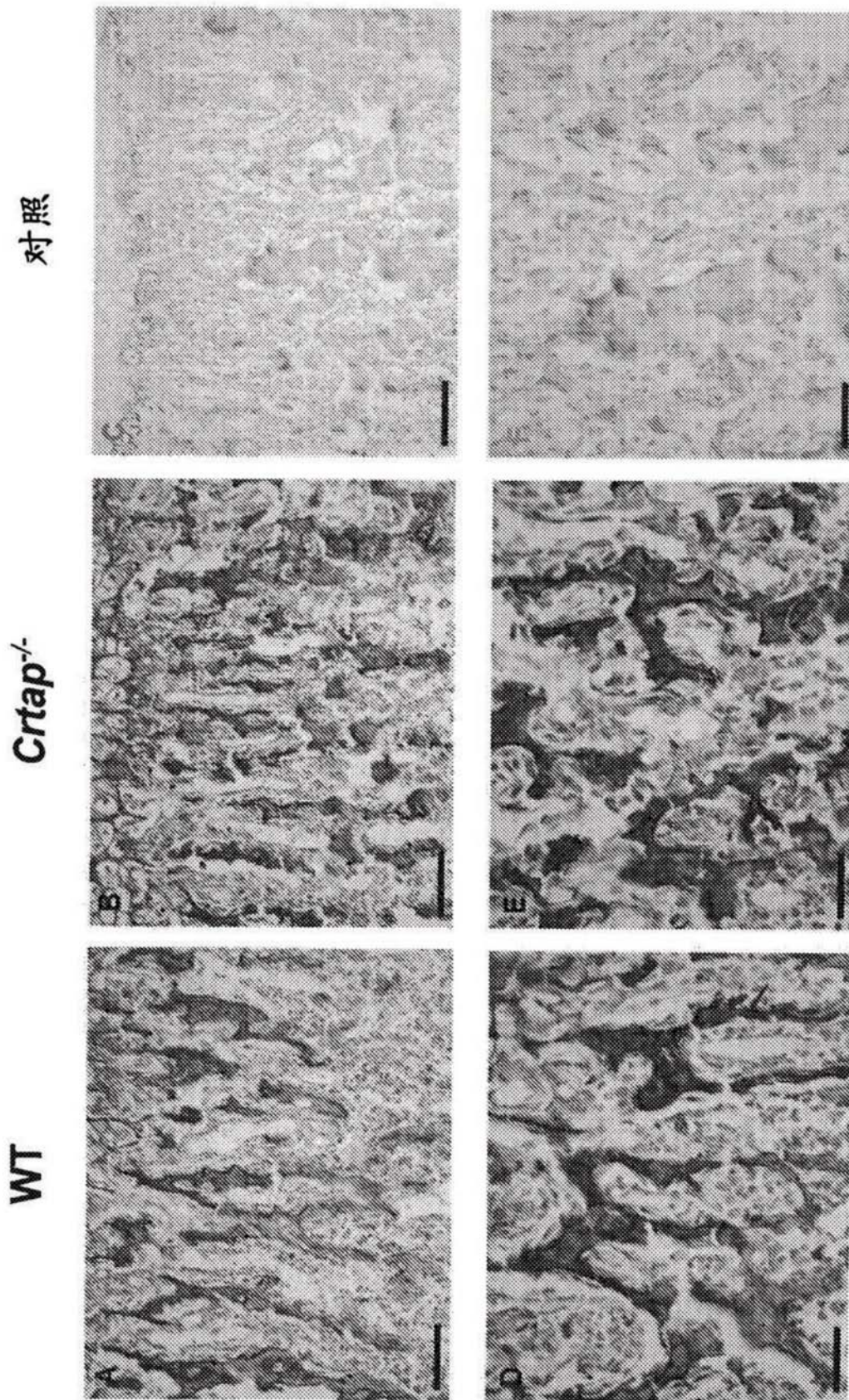


图24

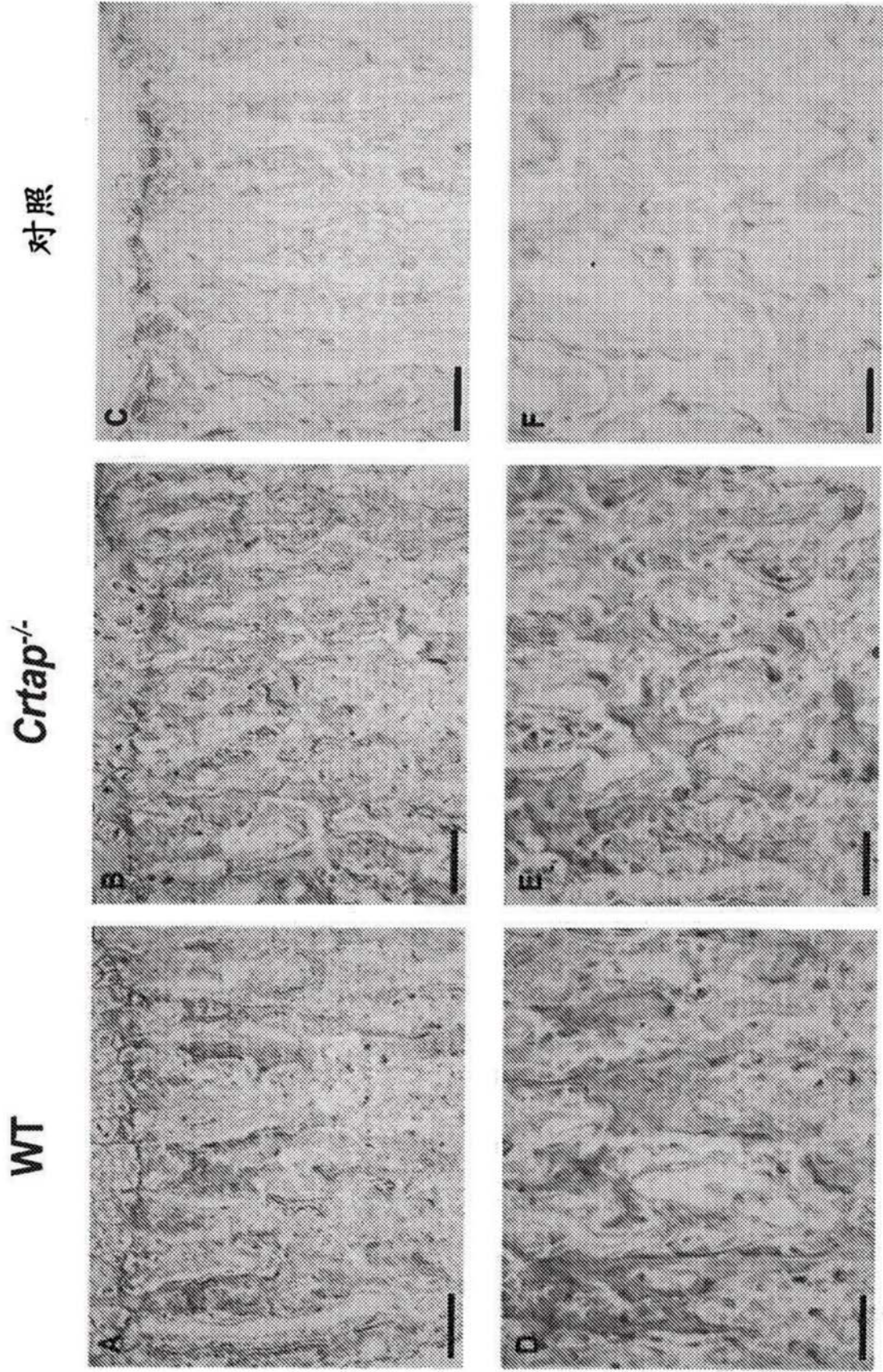


图25

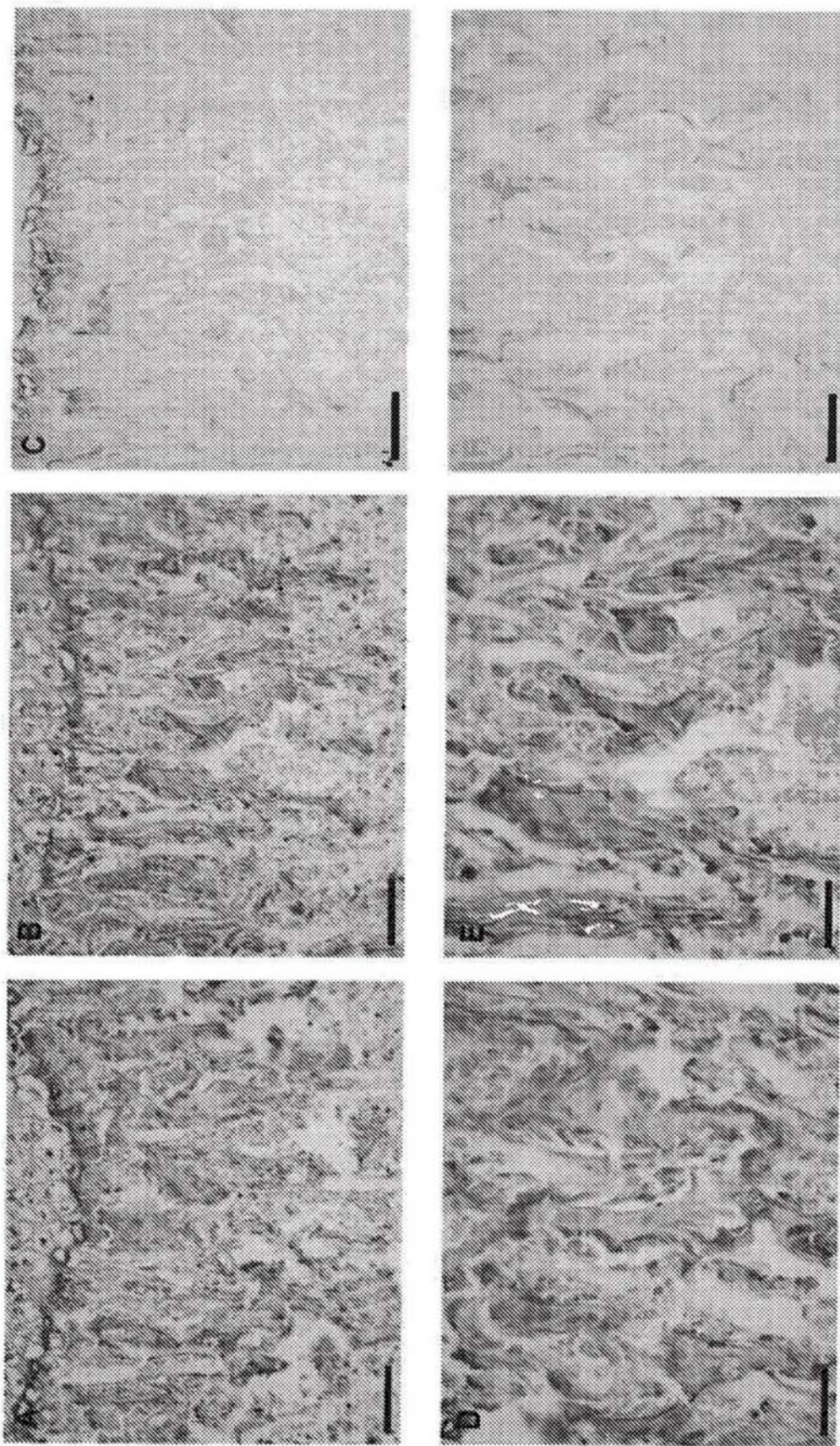


图26