



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116249713 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 09

(21) 申请号 202180063332.2

J·梅格纳 L·莫顿

(22) 申请日 2021.08.19

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(30) 优先权数据

专利代理师 陈迎春 黄革生

63/068,251 2020.08.20 US

63/111,394 2020.11.09 US

63/139,234 2021.01.19 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/046765 2021.08.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/040461 EN 2022.02.24

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

权利要求书4页 说明书43页

序列表69页 附图16页

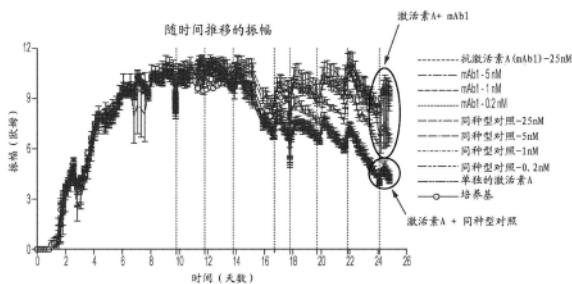
(72) 发明人 D·格拉斯 S·麦克唐内尔

(54) 发明名称

利用激活素A拮抗剂预防和治疗心功能不全和COVID-19的方法

(57) 摘要

本发明提供用于预防和治疗心功能不全(包括心肌病和心力衰竭)的方法。本发明的方法的特征在于施用激活素A的拮抗剂,例如,治疗有效量的与人激活素A结合并降低或中和人激活素A的活性的抗体。本发明的方法可用于预防和治疗多种原因的心脏病,包括病毒性疾病,例如,COVID-19。



1. 一种在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法,所述方法包括向所述受试者施用激活素A特异性拮抗剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述激活素A特异性拮抗剂是抗激活素A抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中在25°C下,在表面等离子共振分析法中测量,所述抗体或其抗原结合片段以小于约5pM的结合解离平衡常数(K_D)特异性地结合激活素A。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中在25°C下,在表面等离子共振分析法中测量,所述抗体或其抗原结合片段以小于约4pM的 K_D 特异性地结合激活素A。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段以小于约500nM的结合缔合平衡常数(K_a)特异性地结合激活素A。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断至少一种激活素A受体与激活素A的结合。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断激活素A对至少一种激活素A受体的激活。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段不显著阻断激活素A与激活素II型受体的结合。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断激活素A与激活素A受体的结合,在25°C下,在体内受体/配体结合生物测定中测量的其 IC_{50} 值小于约80pM。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断激活素A与激活素A受体的结合,在25°C下,在体内受体/配体结合生物测定中测量的其 IC_{50} 值小于约60pM。

11. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制激活素A与选自以下的激活素A受体的结合:激活素IIA型受体(ActRIIA)、激活素IIB型受体(ActRIIB)和激活素I型受体。

12. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制激活素A介导的SMAD复合物信号传导的激活。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区(HCVR)的互补性决定区(CDR),其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202;以及(b)轻链可变区(LCVR)的CDR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对的所述重链CDR和轻链CDR:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含选自以下的所述氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16;20-22-24-28-30-32;36-38-40-44-46-48;52-54-56-60-62-64;68-70-72-76-78-80;84-86-88-92-94-96;100-102-104-92-94-96;108-110-112-92-94-96;116-118-120-92-94-96;124-126-128-92-94-96;

132-134-136-92-94-96;140-142-144-148-150-152;156-158-160-148-150-152;164-166-168-148-150-152;172-174-176-148-150-152;180-182-184-148-150-152;188-190-192-148-150-152;196-198-200-148-150-152;和204-206-208-212-214-216。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:(a) HCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202;以及(b) LCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。

18. 一种在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法,所述方法包括施用特异性地结合激活素A的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含所述SEQ ID NO:68-70-72-76-78-80的氨基酸序列。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:包含所述SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR和包含所述SEQ ID NO:74的氨基酸序列的LCVR。

20. 一种在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法,所述方法包括施用特异性地结合激活素A的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含所述SEQ ID NO:164-166-168-148-150-152的氨基酸序列。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:包含所述SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCVR和包含所述SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCVR。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段是包含IgG重链恒定区的人抗体。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述IgG重链恒定区属于IgG1同种型。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述IgG重链恒定区属于IgG4同种型。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段与GDF8拮抗剂组合施用。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中GDF8拮抗剂选自抑制GDF8的融合蛋白、抗GDF8抗体和抗GDF8抗体的抗原结合片段。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述GDF8拮抗剂是抗GDF8抗体或其抗原结合片段。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述抗GDF8抗体或其抗原结合片段包含具有所述SEQ ID NO:217的氨基酸序列的HCVR的CDR和具有所述SEQ ID NO:221的氨基酸序列的LCVR的CDR。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述抗GDF8抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含所述SEQ ID NO:218-219-220-222-223-224的氨基酸序列。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述抗GDF8抗体或其抗原结合片段包含具有所述SEQ ID NO:217的氨基酸序列的HCVR和具有所述SEQ ID NO:221的氨基酸序列的LCVR。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述受试者已经被诊断患有病毒感染。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述病毒感染是冠状病毒感染。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述冠状病毒是严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2)。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述受试者具有严重的COVID-19症状。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述受试者具有危急的COVID-19症状。

36. 一种治疗已测试为严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 感染阳性的受试者的COVID-19的方法,所述方法包括向所述受试者施用激活素A特异性拮抗剂。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述激活素A特异性拮抗剂是抗激活素A抗体或其抗原结合片段。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对的所述重链CDR和轻链CDR:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含选自以下的所述氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16;20-22-24-28-30-32;36-38-40-44-46-48;52-54-56-60-62-64;68-70-72-76-78-80;84-86-88-92-94-96;100-102-104-92-94-96;108-110-112-92-94-96;116-118-120-92-94-96;124-126-128-92-94-96;

132-134-136-92-94-96;140-142-144-148-150-152;156-158-160-148-150-152;164-166-168-148-150-152;172-174-176-148-150-152;180-182-184-148-150-152;188-190-192-148-150-152;196-198-200-148-150-152;和204-206-208-212-214-216。

40. 根据权利要求37至39中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:(a)HCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202;以及(b)LCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。

42. 根据权利要求37所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含所述SEQ ID NO:68-70-72-76-78-80的氨基酸序列。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:包含所述SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR和包含所述SEQ ID NO:74的氨基酸序列的LCVR。

44. 根据权利要求37所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-

HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,所述结构域分别包含所述SEQ ID NO:164-166-168-148-150-152的氨基酸序列。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段包含:包含所述SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCVR和包含所述SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCVR。

46. 根据权利要求37至45中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段是包含IgG重链恒定区的人抗体。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述IgG重链恒定区属于IgG1同种型。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述IgG重链恒定区属于IgG4同种型。

49. 根据权利要求36至48中任一项所述的方法,其中所述受试者具有需要辅以氧气吸入术的严重COVID-19症状。

50. 根据权利要求36至48中任一项所述的方法,其中所述受试者具有需要机械通气或在重症监护病房中治疗的危急COVID-19症状。

利用激活素A拮抗剂预防和治疗心功能不全和COVID-19的方法

[0001] 对序列表的参考

[0002] 本专利申请以引用方式并入于2021年8月19日创建并含有87,383个字节的以计算机可读形式作为文件10771W001-Sequence提交的序列表。

技术领域

[0003] 本发明属于医药领域,并且涉及用激活素A拮抗剂预防和治疗心功能不全的方法和药物组合物,该激活素A拮抗剂包括抗激活素A抗体及其抗原结合片段、或者此类抗体或抗原结合片段与肌肉生长抑制素抑制剂的组合。

背景技术

[0004] 激活素属于转化生长因子- β (TGF- β) 超家族并对细胞增殖、分化和凋亡发挥广泛的生物效应。激活素是抑制素 β A、抑制素 β B、抑制素 β C和抑制素 β E的同源二聚体或异源二聚体,它们的不同组合产生激活素蛋白组的不同成员。例如,激活素A是抑制素 β A的同源二聚体,并且激活素B是抑制素 β B的同源二聚体,而激活素AB是抑制素 β A和抑制素 β B的异源二聚体,并且激活素AC是抑制素 β A和抑制素 β C的异源二聚体(Tsuchida,K.等人,Cell Commun Signal 7:15(2009))。

[0005] 激活素A结合并激活细胞表面上称为激活素II型受体(IIA型和IIB型,也分别称为ActRIIA和ActRIIB)的受体复合物。这些受体的激活导致I型激活素受体(例如,Alk4或7)的磷酸化,这继而导致SMAD 2和SMAD 3蛋白的磷酸化、SMAD复合物的形成(SMAD4)、以及SMAD复合物向细胞核的转位,其中SMAD2和SMAD3起调节各种基因转录的作用(Sozzani,S.和Musso,T.,Blood 117(19):5013-5015(2011))。

[0006] 与ActRIIB结合并激活ActRIIB的激活素A或其他配体(包括GDF8(肌肉生长抑制素)、激活素B、激活素AB、抑制素A、抑制素B、GDF3、GDF11、Nodal、BMP2、BMP4、BMP7、BMP9和BMP10)已与多种病症相关,包括衰老和疾病中的肌肉萎缩以及肺和心脏病症。例如,激活素A在小鼠气道中的过表达已经涉及关联急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的肺病理学,其通过用由与人IgG1的Fc部分融合的激活素II型受体ActRIIB的细胞外部分组成的融合蛋白中和激活素A而被减轻(Apostolou等人,Am J Respir Crit Care Med.,185(4):382-391)。类似地,激活素II型受体(ActRII)配体已经涉及心脏衰老和心力衰竭。用阻断ActRIIA和ActRIIB的抗体(CDD866)或用通过结合循环ActRII配体来阻断途径激活的ActRIIB-Fc融合蛋白(RAP-031)抑制ActRII途径减少了心脏ActRII信号转导,同时恢复或保持心脏功能(Roh等人,Sci.Transl.Med,11,eaau8680,2019)。

[0007] 已知与多种ActRII配体结合或通常抑制ActRII信号转导的药剂当施用于人类患者时引起各种不良作用。许多ActRII配体的独特作用尚未完全阐明,并且存在对可提供临床益处的ActRII配体的特异性抑制剂的需要。

发明内容

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法,该方法包括向受试者施用激活素A特异性拮抗剂。

[0009] 在一些实施方案中,激活素A特异性拮抗剂是抗激活素A抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,在25°C下,在表面等离子共振分析法中测量,抗体或其抗原结合片段以小于约5pM的结合解离平衡常数(K_D)特异性地结合激活素A。在一些情况下,在25°C下,在表面等离子共振分析法中测量,抗体或其抗原结合片段以小于约4pM的 K_D 特异性地结合激活素A。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段以小于约500nM的结合缔合平衡常数(K_a)特异性地结合激活素A。

[0010] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段阻断至少一种激活素A受体与激活素A的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段阻断激活素A对至少一种激活素A受体的激活。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段不显著阻断激活素A与激活素II型受体的结合。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段阻断激活素A与激活素A受体的结合,在25°C下,在体内受体/配体结合生物测定中测量的其 IC_{50} 值小于约80pM。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段阻断激活素A与激活素A受体的结合,在25°C下,在体内受体/配体结合生物测定中测量的其 IC_{50} 值小于约60pM。

[0011] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段抑制激活素A与选自以下的激活素A受体的结合:激活素IIA型受体(ActRIIA)、激活素IIB型受体(ActRIIB)和激活素I型受体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段抑制激活素A介导的SMAD复合物信号传导的激活。

[0012] 在各种实施方案中的任一个中,抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区(HCVR)的互补性决定区(CDR),其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202;以及(b)轻链可变区(LCVR)的CDR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对的重链CDR和轻链CDR:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其分别包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16;20-22-24-28-30-32;36-38-40-44-46-48;52-54-56-60-62-64;68-70-72-76-78-80;84-86-88-92-94-96;100-102-104-92-94-96;108-110-112-92-94-96;116-118-120-92-94-96;124-126-128-92-94-96;132-134-136-92-94-96;140-142-144-148-150-152;156-158-160-148-150-152;164-166-168-148-150-152;172-174-176-148-150-152;180-182-184-148-150-152;188-190-192-148-150-152;196-198-200-148-150-152;和204-206-208-212-214-216。

[0013] 在各种实施方案中的任一个中,抗体或抗原结合片段包含:(a)HCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202;以及(b)LCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、

和202/210。

[0014] 在一个方面,本发明提供了一种在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法,该方法包括施用特异性地结合激活素A的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,该结构域分别包含SEQ ID NO:68-70-72-76-78-80的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR和包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的LCVR。

[0015] 在一个方面,本发明提供了一种在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法,该方法包括施用特异性地结合激活素A的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,该结构域分别包含SEQ ID NO:164-166-168-148-150-152的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCVR和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCVR。

[0016] 在各种实施方案中的任一个中,抗体或抗原结合片段可以是包含IgG重链恒定区的人抗体。在一些实施方案中,IgG重链恒定区属于IgG1同种型。在一些实施方案中,IgG重链恒定区属于IgG4同种型。

[0017] 在各种实施方案中的任一个中,该方法还包括与GDF8拮抗剂组合施用抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,GDF8拮抗剂选自抑制GDF8的融合蛋白、抗GDF8抗体和抗GDF8抗体的抗原结合片段。在一些情况下,GDF8拮抗剂是抗GDF8抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗GDF8抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:217的氨基酸序列的HCVR的CDR和具有SEQ ID NO:221的氨基酸序列的LCVR的CDR。在一些实施方案中,抗GDF8抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其分别包含SEQ ID NO:218-219-220-222-223-224的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗GDF8抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:217的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:221的氨基酸序列的LCVR。

[0018] 在上文或本文所讨论的各种实施方案中的任一个中,受试者已被诊断患有病毒感染。在一些实施方案下,病毒感染是冠状病毒感染。在一些情况下,冠状病毒是严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)。在一些情况下,受试者具有严重的COVID-19症状。在一些情况下,受试者具有危急的COVID-19症状。

[0019] 在另一方面,本发明提供了用于在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的药物组合物,其包含激活素A特异性拮抗剂(例如,重组人抗激活素A抗体或其抗原结合片段,如上文或本文所讨论的)和药学上可接受的载体。

[0020] 在另一方面,本发明提供了激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段,如上文或本文所讨论的),其用于在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭的方法。

[0021] 在另一方面,本发明提供了一种治疗已测试为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)感染阳性的受试者的COVID-19的方法,该方法包括向受试者施用激活素A特异性拮抗剂。在一些实施方案中,激活素A特异性拮抗剂是抗激活素A抗体或其抗原结合片段。

[0022] 在一些情况下,抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对的重链CDR和轻链CDR:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其分别包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16;20-22-24-28-30-32;36-38-40-44-46-48;52-54-56-60-62-64;68-70-72-76-78-80;84-86-88-92-94-96;100-102-104-92-94-96;108-110-112-92-94-96;116-118-120-92-94-96;124-126-128-92-94-96;132-134-136-92-94-96;140-142-144-148-150-152;156-158-160-148-150-152;164-166-168-148-150-152;172-174-176-148-150-152;180-182-184-148-150-152;188-190-192-148-150-152;196-198-200-148-150-152;和204-206-208-212-214-216。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包含:(a) HCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202;以及(b) LCVR,其包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包含选自以下的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其分别包含SEQ ID NO:68-70-72-76-78-80的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR和包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的LCVR。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其分别包含SEQ ID NO:164-166-168-148-150-152的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCVR和包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCVR。

[0023] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是包含IgG重链恒定区的人抗体。在一些情况下,IgG重链恒定区属于IgG1同种型。在一些情况下,IgG重链恒定区属于IgG4同种型。

[0024] 在一些实施方案中,受试者具有辅以氧气吸入术的严重COVID-19症状。在一些实施方案中,受试者具有需要机械通气或在重症监护病房中治疗的危急COVID-19症状。

[0025] 在另一方面,本发明提供了激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段,如上文或本文所讨论的)在制造药物中的用途,该药物用于在对其有需要的受试者中预防或治疗心功能不全或心力衰竭、或者用于治疗COVID-19患者。

[0026] 在各个实施方案中,上文或本文所讨论的实施方案的特征或组分中的任何特征或组分可以组合,并且此类组合涵盖在本公开的范围。上文或本文所讨论的任何特定值可以与上文或本文所讨论的另一个相关值组合以列举具有表示范围的上端和下端的值的范围,并且此类范围涵盖在本公开的范围。

[0027] 通过阅读随后的具体实施方式,其他实施方案将变得显而易见。

附图说明

[0028] 图1A和图1B是显示在用激活素A单次处理(图1A)或用激活素A多次处理(图1B)后,激活素A对培养物中的人诱导的多能干细胞的阻抗振幅的负面影响的图。

[0029] 图2是显示抗激活素A抗体 (mAb1) 对人诱导的多能干细胞中激活素A介导的心功能不全的预防效果的图。

[0030] 图3是显示与对照相比, COVID-19患者的血清样品中激活素A、卵泡抑素相关基因 (FLRG) 和纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) 的相对增加的一系列图。

[0031] 图4是显示COVID-19患者的疾病严重程度与激活素A和FLRG的血清含量之间的相关性的一组图。

[0032] 图5是显示与健康的年龄匹配的对照相比, COVID-19患者的不同年龄组的血清样品中激活素A和FLRG的相对含量的一组图。

[0033] 图6是显示COVID-19患者的疾病严重程度与PAI-1的血清含量之间的相关性的图。

[0034] 图7是显示COVID-19患者的疾病严重程度与男性 (左图) 和女性 (右图) 的PAI-1的血清含量之间的相关性的一组图。

[0035] 图8是显示与健康的年龄匹配的对照相比, COVID-19患者的不同年龄组的血清样品中PAI-1的相对含量的图。

[0036] 图9是显示用皮质类固醇治疗没有显著影响患有严重或危急COVID-19症状的患者中激活素A和FLRG的血清含量的一组图。

[0037] 图10是显示用激活素A处理的IPSC心肌细胞中心脏应激的基因标志物 (NPPA-心房利钠肽和NPPB-B型利钠肽) 和激活素A信号转导基因 (FSTL3-卵泡抑素样3蛋白, 也称为FLRG, 和Serpine1, 也称为PAI-1) 的激活的一组图。

[0038] 图11是显示IKK/NF κ B途径主要负责IL1 β 和TNF α 的激活素A诱导的图。

[0039] 图12是显示暴露于激活素A的人诱导多能干细胞衍生 (IPSC) 心肌细胞中SMAD2/3磷酸化的增加以及用抑制性抗激活素A抗体 (mAb2) 阻断SMAD2/3磷酸化的这种增加的蛋白质印迹和图。对照mAb是结合不相关的非人抗原的抗体。

[0040] 图13A和图13B是显示在慢性暴露于激活素A的心肌细胞中延长的动作电位、场电位振幅的降低、和降低的场电位下行速度, 以及在抑制性抗激活素A抗体 (mAb1) 的存在下防止这些作用的图。

[0041] 图14A和图14B是显示在慢性暴露于激活素A的心肌细胞中降低的峰值钙通量振幅、增加的钙通量下降时间、和增加的钙通量上升时间, 以及在抑制性抗激活素A抗体 (mAb1) 的存在下防止这些作用的图。

具体实施方式

[0042] 在描述本发明之前, 应当理解, 本发明不限于所描述的特定方法和实验条件, 因为此类方法和条件可以变化。还应理解, 本文所使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的, 而不旨在是限制性的, 因为本发明的范围仅受所附权利要求书限制。

[0043] 除非另外定义, 否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所使用的, 当用于提及具体所列举的数值时, 术语“约”意指数值可以与所列举的值相差不超过1%。例如, 如本文所使用的, 表述“约100”包含99和101以及其之间的所有值 (例如, 99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0044] 尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料, 但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和

非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0045] 预防和/或治疗心功能不全和心力衰竭的方法

[0046] 本发明提供用于预防和/或治疗心功能不全和心力衰竭的方法。在一些实施方案中，本发明提供用于治疗、预防和/或降低心力衰竭的严重程度或进展、或者心力衰竭的一种或多种并发症的方法。在一些实施方案中，本发明提供改善人心肌细胞功能(包括收缩力和电特性)的方法。

[0047] 如本文所讨论的，已经发现激活素A特异性拮抗剂(例如，抗激活素A抗体或其抗原结合片段)在治疗和预防心功能不全和心力衰竭的各种并发症方面提供了令人惊讶的效果。例如，抗激活素A抗体可用于预防或降低心脏肥大、心脏重塑和心脏纤维化的严重程度以及改善主动脉弓缩窄(TAC)心力衰竭模型中的心脏功能。此外，激活素A特异性拮抗剂治疗可增加心力衰竭患者的存活时间。因此，本公开部分地提供单独或与一种或多种其他支持性疗法和/或其他活性剂组合使用激活素A特异性拮抗剂(例如，抗激活素A抗体或其抗原结合片段)来治疗、预防或降低心力衰竭的严重程度，特别是治疗、预防或降低心力衰竭的一种或多种并发症(例如，心脏肥大、心脏重塑和心脏纤维化)的严重程度，以及改善心脏功能并增加心力衰竭患者的存活时间的方法。

[0048] 如本文所用，“预防”障碍或病症的治疗剂是指在统计样本中，相对于未治疗的对照样本，降低了经治疗的样本中障碍或病症的发生，或者相对于未治疗的对照样本，延迟了障碍或病症的发作的化合物。如本文所用，术语“治疗”包括改善或消除已经确定的病症。在任一情况下，预防或治疗可在由医师或其他卫生保健提供者提供的诊断和施用治疗剂的预期结果中辨别。

[0049] 通常，通过以有效量施用一种或多种激活素A特异性拮抗剂(例如一种抗激活素A抗体或其抗原结合片段)来实现如本公开中所述的疾病或病症的治疗或预防。有效量的试剂是指在所需剂量和时间段有效实现期望的治疗或预防结果的量。本公开的治疗有效量的试剂可根据因素诸如个体的疾病状态、年龄、性别和重量以及试剂在个体中引发期望应答的能力而变化。预防有效量是指在所需剂量和时间段有效实现期望的预防结果的量。

[0050] 心力衰竭是由某些心脏结构或功能异常所导致的典型症状和体征所定义的临床综合征(用于诊断和治疗急性和慢性心力衰竭的ESC指南。McMurray J J等人,European Heart Journal 2012,14(8):803-69;2013ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure,Yanzy C W等人,Circulation 2013,128,e240-e327)。例如，心脏异常可能损害充盈或射出血液的能力，和/或导致不能递送足够的氧气以满足代谢组织的需求，尽管充盈压力正常，或仅在增加的充盈压力下方可满足需求。如本文所用，术语心力衰竭包括多种心血管病症，其包括但不限于由于左心室功能障碍引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、由于主动脉瓣狭窄引起的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心脏(心室)衰竭、左侧心脏(心室)衰竭、双心室心力衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭。心力衰竭还包括与心脏中液体积累有关的心脏病，例如心肌水肿。

[0051] 通常，心力衰竭的临床表现包括例如呼吸困难(呼吸短促)、端坐呼吸、突发性夜间呼吸困难和疲劳(其可能限制运动能力)、体液潴留(其可能导致例如肺充血和末梢水肿)、

心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌症、心脏肥大、心源性哮喘、夜尿、腹水、充血性肝病、凝血病、肾血流减少、肾功能不全、心肌梗死和卒中。

[0052] 尽管短语“充血性心力衰竭”通常用于描述所有类型的心力衰竭,包括上文列出的类型,但充血性心力衰竭更准确地描述与肺部中的肺充血或积液有关的心力衰竭的症状。这种充血更常见的症状是心脏收缩和左侧心力衰竭。随着肺系统的效率下降,心脏输入侧附近增加的血容量改变了肺泡动脉接合部处的压力,该肺泡动脉接合部是肺毛细血管与肺的肺泡空间之间的接合部。接合部处压力的变化导致血浆被推出进入肺中的肺泡腔。呼吸困难和全身疲劳是充血性心力衰竭的典型体感表现。

[0053] 有许多不同的方式对心力衰竭进行分类。例如,心力衰竭可以基于所涉及的心脏的一侧来表征(左心衰竭对右心衰竭)。右心衰竭损害流向肺的肺部血流量。左心衰竭损害流向身体和脑的主动脉血流量。衰竭的混合表现是常见的;长期来看,左心衰竭经常导致右心衰竭。心力衰竭还可以根据异常是否是由于收缩不足(收缩功能障碍;收缩性心力衰竭)、或由于心脏舒张不足(舒张功能障碍;舒张性心力衰竭)、或以上两者来分类。另外,心力衰竭可根据问题是否主要在于增加的静脉背压(前负荷)或不能提供足够的动脉灌注(后负荷)来分类。心力衰竭可根据异常是否由于具有高全身血管阻力的低心输出量还是由于具有低血管阻力的高心输出量来分类(低输出心力衰竭对高输出心力衰竭)。另外,心力衰竭可以基于共存疾病的程度来分类,例如心力衰竭/全身性高血压、心力衰竭/肺动脉高血压、心力衰竭/糖尿病和心力衰竭/肾衰竭。

[0054] 此外,心力衰竭可基于由心脏异常导致的功能损伤的程度来分类。功能分类通常根据纽约心脏协会(New York Heart Association,NYHA)功能分类。分类(I-IV)为:I类:任何活动都不受限制;普通活动无症状;II类:活动受到轻微限制;患者在休息或轻度运动时舒适;III类:任何活动都受到显著限制;患者仅在休息时舒适;以及IV类:任何身体活动均引起不适并且症状在休息时发生。该评分记录了症状的严重程度并可用于评估对治疗的反应。

[0055] 在其2001指南中,美国心脏病学会(American College of Cardiology)/美国心脏协会(ACC)工作组引入了心力衰竭的四个阶段[参见,例如,Hunt,S.,“ACC/AHA 2005Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult:A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines(Writing Committee to Update the 2001Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure),”J.Am,Coll.Cardiol,46:e1-e82(2005)。第一阶段,阶段A,为处于心力衰竭高风险但没有结构性心脏疾病或心力衰竭症状的受试者(例如,这些患者是患有高血压、动脉粥样硬化疾病、糖尿病、肥胖、代谢综合症的患者或使用心脏毒素的患者)。第二阶段,阶段B,为患有结构性心脏疾病但没有体征或心力衰竭症状的受试者(例如,这些患者是以前患有心肌梗死、表现出心脏重塑(包括肥大和低射血分数)的患者,以及患有无症状瓣膜病的患者)。第三阶段,阶段C,为患有结构性心脏病且具有先前或当前心力衰竭症状的受试者(例如,这些患者是患有已知结构性心脏病并且表现出呼吸短促和疲劳并且具有降低的运动能力的患者)。第四和最后阶段,阶段D,为需要专门干预的难治性心力衰竭(例如,尽管进行了最大程度的医学治疗,但在休息时仍具有显著症状的患者(即,在没有专门干预的情况下反

复住院或不能安全出院的那些患者)。ACC分阶段系统是有用的,因为阶段A涵盖“前心力衰竭”--其中干预治疗可大概率防止发展成明显症状的阶段。ACC阶段A不具有相应的NYHA分级。ACC阶段B将对应于NYHA I级。ACC阶段C对应于NYHA II级和III级,而ACC阶段D与NYHA IV级重叠。

[0056] 通常先于心力衰竭的临床体征之前的心脏重塑是指临床表现为通常由心脏负荷或损伤引起的心脏大小、形状和功能的变化的分子、细胞和/或间质变化(Cohn J N等人, JACC 2000. 35 (3) :569-82)。心脏重塑的触发因素包括例如心肌梗塞、高血压、壁应力、炎症、压力过载和容量负荷过重。心肌结构的改变可在损伤的几小时内快速发生,并且可发展数月和数年。虽然最初是有益的,但这些变化可随时间(数月至数年)推移将心肌功能损害至慢性顽固性心力衰竭的程度。心脏重塑的标志包括,例如,心室扩张、心室球形度的增加以及间质和血管周围纤维化的发展。球形度的增加与二尖瓣关闭不全正相关。心室扩张主要由心肌细胞肥大和延长引起,并且在较小程度上由心室质量增加引起。

[0057] 在一些实施方案中,本公开的激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)可用于治疗、预防或减少心脏重塑的进展。例如,激活素A特异性拮抗剂可用于维持受试者心脏的心肌结构或减少受试者心脏心肌结构的改变。心脏重塑的进展可通过比较两组受试者之间一段时间内心脏心肌结构的改变来评估,其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗,并且第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂代替或取代通过本发明方法的治疗来治疗。如果治疗组的受试者心脏的心肌结构的改变小于安慰剂组的受试者心脏的心肌结构的改变,则确定心脏重塑的进展已经减少。用于确定疾病进展或发展(例如心脏重塑)的方法可以使用熟知的方法来评估,包括例如物理检查、与多普勒血流研究结合的2维超声心动图、超声、MRI、计算机断层扫描、心导管插入术、放射性核素成像(例如放射性核素心室造影)、以及它们的任何组合。

[0058] 一般来讲,心脏重塑和心力衰竭由引起心脏工作负荷或损伤持续增加的病症和病况引起。导致心力衰竭的病症和病况包括例如心肌梗死后活心肌的损失、冠心病、高血压、心肌病(例如、扩张型心肌病、由感染或酒精/药物滥用引起的心肌病等)、心脏瓣膜疾病和功能障碍,包括例如主动脉瓣疾病(例如,主动脉瓣关闭不全、主动脉瓣返流和主动脉瓣狭窄(主动脉瓣狭窄))、肺病(例如,肺动脉高血压)、先天性心脏缺陷、急性缺血性损伤、再灌注损伤、心包膜病症和异常、心肌病症、大血管病症、心内膜病症、心房纤维性颤动、左心室心肌功能受损、右心室心肌功能受损、心律失常、甲状腺疾病、肾病、糖尿病、使其不能泵出足够血的心肌弱化、甲状腺疾病、神经激素失衡、病毒感染和贫血症。由于此类病症和病况可能导致心脏重塑和/或心力衰竭,根据本发明,患有或怀疑患有的一种或多种这些病症的受试者是用一种或多种激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)、任选地与一种或多种另外的活性剂或用于治疗心脏重塑和/或心力衰竭的支持性疗法组合进行治疗的优选受试者。在一些实施方案中,具有心脏重塑体征(例如,心肌肥大和心室扩张)或具有明显心力衰竭的受试者,即使当不能检测到潜在病因时,也适于根据本公开的治疗,因为预防进一步的心脏重塑或治疗现有心脏重塑或减少心脏重塑在这些受试者中将是有益的。在一些实施方案中,具有心脏重塑和/或心力衰竭发展的风险因子的受试者(例如,具有可导致本文所述的心脏重塑和/或慢性心力衰竭的那些病症的受试者)也适于根据本公开进行治疗。

[0059] 一般来讲,血压过高或高血压是指用例如血压计测量的大于120mmHg(收缩压)/80mmHg(舒张压)的静息血压。介于121-139/81-89之间的血压被认为是高血压前期,而高于该水平的血压(140/90mmHg或更高)被认为是高血压(高血压)。除非另外指明,高血压前期和高血压都包括在如本文所用的“高血压”的含义中。例如,135mmHg/87或140mmHg/90mmHg的静息血压旨在在术语“高血压”的范围内,即使135/87通常被认为在高血压前期的类别内。145mmHg/90mmHg、140mmHg/95mmHg和142mmHg/93mmHg的血压是高血压的其他示例。应当理解,血压通常在全天内变化。它甚至可以随每次心跳而轻微变化。通常,它在活动期间增加而在休息时减少。它通常在寒冷天气时更高,并且当在应激时可能升高。通过每天监测血压可以获得更准确的血压读数,其中每天在相同时间采集血压读数以最小化外部因素的影响。可能需要随时间推移的若干读数来确定血压是否是高的。一般来讲,慢性高血压是指连续或间歇地表现出高血压时间段延长的受试者,该延长的时间段例如但不限于至少一周、至少两周、至少三周、至少四周、至少两个月、至少六个月、至少一年、至少两年、至少三年、至少四年、至少五年、至少10年等。

[0060] 一般来讲,心律失常是指心脏的肌肉收缩变得不规则的状况。异常快速的心律(例如,每分钟超过100次心跳)称为心动过速。异常缓慢的心律(例如,每分钟少于60次心跳)称为心动过缓。

[0061] 一般来讲,心脏肥大是指心脏增大,这是一种以心脏和单个心肌细胞(特别是心室肌细胞)的尺寸增加以及心室内腔尺寸增加为特征的疾病。

[0062] 射血分数是每次心跳从左心室泵出的血液的百分比。射血分数可以例如在超声心动图期间测量。射血分数是心脏泵送的良好程度的重要量度,并且可用于对心力衰竭进行分类并指导治疗。心力衰竭可分类为射血分数保留的心力衰竭(也称为舒张性心力衰竭)或射血分数降低的心力衰竭(也称为收缩性心力衰竭)。最近的研究表明,具有保留的射血分数的心力衰竭的患病率在15年期间增加,死亡率没有显著改善。如果这些趋势继续,则具有保留的射血分数的心力衰竭可能变成心力衰竭的最常见形式,呈现为不断增长的公共健康问题(Owan等人,2006,N Engl J Med;355(3):251-9)。

[0063] 在一些实施方案中,本公开的激活素A特异性拮抗剂可用于降低非致命或致命心血管事件的发生率(例如,心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、体液潴留和心力衰竭进展)。如本文所用,减少心血管事件的发生率是指维持或减少受试者在一段时间内或经一段时间所经历的心血管事件的数目。心血管事件发生率的降低可通过比较两组受试者之间在一段时间内或经一段时间的心血管事件的发生率来评估或确定,其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗,并且第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即,假药丸)代替或取代通过本发明方法的治疗来治疗。如果治疗组的心血管事件的数目少于安慰剂组的心血管事件的数目,则确定存在或已经存在心血管事件发生率的降低。另选地,心血管事件发生率的降低可通过确定受试者群体在第一时间段的心血管事件的基线数目,然后测量受试者群体在第二较晚时间段的心血管事件的数目来评估或确定。如果受试者群体在第二较晚时间段的心血管事件的数目等于或少于受试者群体在第一时间段的心血管事件的数目,则确定所述受试者群体的心血管事件的发生率已经降低。

[0064] 在一些实施方案中,本公开的激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)可用于降低心力衰竭住院治疗的发生率。如本文所用,减少心力衰竭住院治疗

的发生率是指维持或减少受试者在一段时间内或经一段时间所经历的心力衰竭住院治疗的发生率。心力衰竭住院治疗发生率的降低可通过比较两组受试者之间在一段时间内或经一段时间的心力衰竭住院治疗的发生率来评估或确定,其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗,并且第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即,假药丸)代替或取代通过本发明方法的治疗来治疗。如果治疗组的心力衰竭住院治疗的发生率少于安慰剂组的心力衰竭住院治疗的发生率,则确定存在或已经存在心力衰竭住院治疗发生率的降低。另选地,心力衰竭住院治疗发生率的降低可通过确定受试者群体在第一时间段的心力衰竭住院治疗的基线数目,然后测量受试者群体在第二较晚时间段的心力衰竭住院治疗的数目来评估或确定。如果受试者群体在第二较晚时间段的心力衰竭住院治疗的数目等于或少于受试者群体在第一时间段的心力衰竭住院治疗的数目,则确定所述受试者群体的心力衰竭住院治疗的发生率已经降低。

[0065] 在一些实施方案中,本公开的激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)可用于改善心力衰竭患者的存活率。如本文所用,改善心力衰竭患者的存活率是指维持或减少受试者群体在一段时间内或经一段时间所经历的致命心血管事件的数目。改善心力衰竭患者的存活率可通过比较两组受试者之间在一段时间内或经一段时间的致命心血管事件的发生率来评估或确定,其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗,并且第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即,假药丸)代替或取代通过本发明方法的治疗来治疗。如果治疗组的致命心血管事件的数目少于安慰剂组的致命心血管事件的数目,则确定存在或已经存在心力衰竭患者的存活率的改善。另选地,致命心血管事件发生率的降低可通过确定受试者群体在第一时间段的致命心血管事件的基线数目,然后测量受试者群体在第二较晚时间段的致命心血管事件的数目来评估或确定。如果受试者群体在第二较晚时间段的致命心血管事件的数目等于或少于受试者群体在第一时间段的致命心血管事件的数目,则确定所述受试者群体的心力衰竭患者的存活率已经得到改善。

[0066] 在一些实施方案中,本公开的激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)可用于降低心力衰竭患者的心血管死亡风险。如本文所用,降低心力衰竭患者的心血管死亡风险是指维持或减少受试者群体在一段时间内或经一段时间所经历的致命心血管事件的数目。降低心力衰竭患者的心血管死亡可通过比较两组受试者之间在一段时间内或经一段时间的致命心血管事件的发生率来评估或确定,其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗,并且第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即,假药丸)代替或取代通过本发明方法的治疗来治疗。如果治疗组的致命心血管事件的数目少于安慰剂组的致命心血管事件的数目,则确定存在或已经存在心力衰竭患者的心血管死亡的降低。另选地,心力衰竭患者的心血管死亡的降低可通过确定受试者群体在第一时间段的致命心血管事件的基线数目,然后测量受试者群体在第二较晚时间段的致命心血管事件的数目来评估或确定。如果受试者群体在第二较晚时间段的致命心血管事件的数目等于或少于受试者群体在第一时间段的致命心血管事件的数目,则确定所述受试者群体的心力衰竭患者的心血管死亡已经降低。

[0067] 在一些实施方案中,本公开的激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)可用于治疗具有确认的SARS-CoV-2病毒感染和COVID-19的一种或多种症状(如发烧、咳嗽或呼吸急促)的患者的功能不全。已经报道患有COVID-19和预先存在的心

血管疾病的患者具有增加的严重疾病和死亡的风险。此外,SARS-CoV-2感染已经与多种直接和间接心血管并发症有关,包括急性心肌损伤、心肌炎、心律失常和静脉血栓栓塞(Drigin等人,J Am Coll Cardiol.,75(18):2352-2371,2020年5月)。在COVID-19患者中还报道了与大量前炎性细胞因子和趋化因子的产生相关的高炎症反应(Soy等人,Clinical Rheumatology,doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5,2020年5月)。不受理论的束缚,细胞因子产生的增加可激活增加的激活素A表达,这继而降低心肌细胞收缩振幅、减缓收缩动力学、并损害心肌细胞的钙调控,导致心功能不全,并且在一些情况下导致心力衰竭。

[0068] 目前有多种批准的药物和支持疗法用于管理心力衰竭患者以及处于心力衰竭风险中的患者(例如,患有高血压、脂质失调、糖尿病和血管病症的患者)。此类药物包括,例如,肾上腺素能阻断剂(α -和 β -阻断剂)、中枢作用 α -激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性肌力药、血管扩张剂、苯二氮平类药物、肾素抑制剂、抗血栓形成剂和多种类型的利尿剂(例如,袢、保钾、噻嗪和噻嗪样)。用于治疗或预防心力衰竭的外科手术包括,例如,试图通过气囊血管成形术或支架术增加收缩动脉的内部尺寸的物理操作。在一些实施方案中,本公开提供治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的方法,该方法包括施用激活素A特异性拮抗剂(例如,抗激活素A抗体或其抗原结合片段)与用于治疗、预防或降低心力衰竭进展的其他活性剂或支持性疗法(例如,肾上腺素能阻断剂、中枢作用 α -激动剂、ACE抑制剂、血管紧张素II受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性肌力药、利尿剂和各种外科手术)的组合。

[0069] 激活素A-特异性拮抗剂

[0070] 本发明的方法利用激活素A特异性拮抗剂,包括激活素A特异性结合蛋白、激活素A的小分子抑制剂或激活素A的核苷酸拮抗剂。

[0071] 如本文所用,表达“抗原特异性结合蛋白”意指包含至少一个特异性结合特定抗原的结构域的蛋白。抗原特异性结合蛋白的示例性类别包括抗体、抗体的抗原结合部分、与特定抗原特异性相互作用的肽(例如,肽体)、与特定抗原(但不与其他抗原)特异性相互作用的受体分子、以及包含与特定抗原(但不与其他抗原)特异性结合的受体的配体结合部分的蛋白质。

[0072] 本发明的方法包括使用特异性结合激活素A的抗原特异性结合蛋白,即,“激活素A特异性结合蛋白”。激活素是同源二聚体分子和异源二聚体分子,其包含 β 亚基,即,抑制素 β A、抑制素 β B、抑制素 β C和/或抑制素 β E。 β A亚基具有SEQ ID NO:226的氨基酸序列,并且 β B亚基具有SEQ ID NO:228的氨基酸序列。激活素A是两个 β A亚基的同源二聚体;激活素B是两个 β B亚基的同源二聚体;激活素AB是一个 β A亚基和一个 β B亚基的异源二聚体;并且激活素AC是一个 β A亚基和一个 β C亚基的异源二聚体。激活素A特异性结合蛋白可以是特异性结合 β A亚基的抗原特异性结合蛋白。由于 β A亚基存在于激活素A、激活素AB和激活素AC分子中,“激活素A特异性结合蛋白”可以是特异性结合激活素A以及激活素AB和激活素AC的抗原特异性结合蛋白(通过其与 β A亚基的相互作用)。因此,根据本发明的一个实施方案,激活素A特异性结合蛋白特异性地结合激活素A;或者激活素A和激活素AB;或者激活素A和激活素AC;或者激活素A、激活素AB和激活素AC,但不结合其他ActRIIB配体,例如激活素B、GDF3、GDF8、BMP2、BMP4、BMP7、BMP9、BMP10、GDF11、Nodal等。因此,在本发明的一个实施方案中,激活素A特异性结合蛋白特异性地结合激活素A,但不显著结合激活素B或激活素C。在另一个实施方

案中,激活素A特异性结合蛋白也可结合激活素B(借助于与 β B亚基,即,抑制素BB的交叉反应)。在另一个实施方案中,激活素A特异性结合蛋白是特异性结合激活素A但不结合ActRIIB的任何其他配体的结合蛋白。在另一个实施方案中,激活素A特异性结合蛋白是结合蛋白并且特异性结合激活素A,并且不结合任何骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein,BMP)(例如,BMP2、BMP4、BMP6、BMP9、BMP10)。在另一个实施方案中,激活素A特异性结合蛋白是特异性结合激活素A但不结合转化生长因子 β (TGF β)超家族的任何其他成员的结合蛋白。

[0073] 本发明方法的一些实施方案还包括特异性结合GDF8的抗原特异性结合蛋白,即,“GDF8-特异性结合蛋白”。术语“GDF8”(也称为“生长和分化因子-8”和“肌肉生长抑制素”)是指具有SEQ ID NO:225的氨基酸序列的蛋白(成熟蛋白)。根据这些实施方案,GDF8-特异性结合蛋白特异性地结合GDF8,但不结合其他ActRIIB配体如GDF3、BMP2、BMP4、BMP7、BMP9、BMP10、GDF11、激活素A、激活素B、激活素AB、Nodal等。

[0074] 在本发明的上下文中,包含ActRIIB受体的配体结合部分的诸如ActRIIB-Fc(例如,“ACE-031”或“RAP-031”)的分子不被认为是“激活素A特异性结合蛋白”或“GDF8-特异性结合蛋白”,因为此类分子结合除GDF8、激活素A和激活素AB之外的多个配体。

[0075] 本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及旨在指代相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人版本,除非明确指出其来自非人物种。

[0076] 特异性结合

[0077] 如本文所用,术语“特异性结合”等意指抗原特异性结合蛋白或抗原特异性结合结构域与特定抗原形成复合物,该特定抗原的特征在于解离常数(K_D)为500pM或更小,并且在普通检测条件下不结合其他无关抗原。“无关抗原”是彼此具有小于95%氨基酸同一性的蛋白、肽或多肽。用于确定两个分子是否彼此特异性结合的方法是本领域公知的,并且包括,例如,平衡透析、表面等离子体共振等。例如,如在本发明的上下文中使用的抗原特异性结合蛋白或抗原特异性结合结构域包括结合特定抗原的分子(例如,激活素A和/或激活素AB、或GDF8)或其部分,如在表面等离子共振分析法中测量的,它们具有小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约90pM、小于约80pM、小于约70pM、小于约60pM、小于约50pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约10pM、小于约5pM、小于约4pM、小于约2pM、小于约1pM、小于约0.5pM、小于约0.2pM、小于约0.1pM、或小于约0.05pM的 K_D 。

[0078] 如本文所用,如果当在25°C下,在表面等离子共振分析法中测试与分子的结合时,抗原特异性结合蛋白或抗原特异性结合结构域表现出大于50.0nM的 K_D 、或在这种分析法或其等同分析法中未能表现出任何结合,则该抗原特异性结合蛋白或抗原特异性结合结构域“不结合”特定分子(例如,“不结合GDF11”、“不结合BMP9”、“不结合BMP10”等)。

[0079] 如本文所用,术语“表面等离子体共振”是指允许通过检测生物传感器基质内蛋白浓度的改变来分析实时相互作用的光学现象,例如使用BIAcore™系统(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare,Piscataway,NJ)。

[0080] 如本文所用,术语“ K_D ”意指特定蛋白-蛋白相互作用(例如,抗体-抗原相互作用)的平衡解离常数。除非另有说明,否则本文所公开的 K_D 值是指在25°C下通过表面等离子共振测定确定的 K_D 值。

[0081] 抗体和抗体的抗原结合片段

[0082] 抗原特异性结合蛋白可包含抗体或抗体的抗原结合片段、或者由抗体或抗体的抗原结合片段组成。此外,在抗原结合分子包含两个不同的抗原特异性结合结构域(下文所讨论)的情况下,一个或两个抗原特异性结合结构域可包含抗体的抗原结合片段或由其组成。

[0083] 如本文所用,“结合激活素的抗体”或“抗激活素A抗体”包括结合激活素A蛋白的可溶性片段并且还可结合含有激活素 β A亚基的激活素异源二聚体的抗体及其抗原结合片段。

[0084] 如本文所用,术语“抗体”意指包括与特定抗原(例如激活素A)特异性结合或相互作用的至少一个互补性决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包含包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链以及其多聚体(例如,IgM)的免疫球蛋白分子。每条重链包括重链可变区(本文缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包括轻链可变区(本文缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域(C_L1)。可以将 V_H 区和 V_L 区进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作框架区(FR)的区域。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR构成,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中,抗激活素A抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是天然的或经人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0085] 如本文所使用的,术语“抗体”还包含完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包含任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或经基因工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术从完整抗体分子衍生,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变以及任选地恒定结构域的DNA的重组基因工程技术。此类DNA是已知的和/或易于从例如商业来源、DNA文库(包含例如噬菌体-抗体文库)获得,或可以合成。可以通过化学方法或通过分子生物学技术对DNA进行测序和操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型、或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0086] 抗原结合片段的非限制性示例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 最小识别单元,其由模拟抗体的高变区(例如,分离的互补决定区(CDR)诸如CDR3肽)或受限的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成。其它工程化的分子,如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在如本文所用的表述“抗原结合片段”内。

[0087] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且将通常包括与一个或多个框架序列相邻或在所述框架内的至少一个CDR。在具有与 V_L 结构域相关联的 V_H 结构域的抗原结合片段中, V_H 结构域和 V_L 结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并且含有 V_H - V_H 、 V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体 V_H 或 V_L 结构域。

[0088] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以含有共价连接到至少一个恒定结构

域的至少一个可变结构域。可在本发明抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括：(i) V_H-C_H1 ；(ii) V_H-C_H2 ；(iii) V_H-C_H3 ；(iv) $V_H-C_H1-C_H2$ ；(v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(vi) $V_H-C_H2-C_H3$ ；(vii) V_H-C_L ；(viii) V_L-C_H1 ；(ix) V_L-C_H2 ；(x) V_L-C_H3 ；(xi) $V_L-C_H1-C_H2$ ；(xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ ；以及(xiv) V_L-C_L 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包含上文所列的任何示例性构型)中，可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可以由至少2个(例如，5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成，所述氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外，本发明的抗体的抗原结合片段可以包括上文所列出的任何可变结构域和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)，其彼此非共价缔合和/或与一个或多个单体 V_H 或 V_L 结构域共价缔合(例如，通过一个或多个二硫键)。

[0089] 与完整抗体分子一样，抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如，双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包括至少两个不同的可变结构域，其中每个可变结构域能够特异性地结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。可以使用本领域可用的常规技术将任何多特异性抗体形式(包含本文公开的示例性双特异性抗体形式)适用于本发明抗体的抗原结合片段背景下。

[0090] 在本发明的某些实施方案中，本发明的抗激活素A抗体是人抗体。如本文所用，术语“人抗体”旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)，例如在CDR中，特别是在CDR3中。然而，如本文所使用的，术语“人抗体”并非旨在包含以下抗体，在这些抗体中衍生自另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植于人类构架区序列上。

[0091] 在一些实施方案中，本发明的抗体可以是重组人抗体。如本文所用，术语“重组人抗体”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体，诸如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体(以下进一步描述)、从重组组合人抗体库中分离的抗体(以下进一步描述)、从对于人免疫球蛋白基因而言为转基因的动物(例如，小鼠)中分离的抗体(参见例如，Taylor等人，Nucl Acids Res，第20卷：第6287-6295页，1992年)或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而，在某些实施方案中，此类重组人抗体经历体外诱变(或，当使用转基因人Ig序列的动物时，经历体内体细胞诱变)，并且因此重组抗体的 V_H 区和 V_L 区的氨基酸序列是如下序列：虽然衍生自人种系 V_H 序列和 V_L 序列并与之相关，但可能并非天然体内存在于人抗体种系库中。

[0092] 人抗体可以以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中，免疫球蛋白分子包括约150-160kDa的稳定四链构建体，其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中，二聚体不通过链间二硫键连接，并且形成约75-80kDa的分子，其由共价偶联的轻链和重链(半抗体)构成。即使在亲和纯化之后，这些形式也极难分离。

[0093] 以各种完整IgG同种型形式出现第二种形式的频率基于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可将第二种形式的出现(Angal等人，Molecular Immunology，第30卷：第105页，1993年)显著降低到通常使用人

IgG1铰链所观察到的水平。本发明涵盖在铰链、 C_H2 区或 C_H3 区具有一个或多个突变的抗体，其可能是例如，在生产中所期望的，以提升所期望的抗体形式的产量。

[0094] 本发明的抗体可以是分离的抗体。如本文所使用的，“分离的抗体”意指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如，已经从生物体的至少一种组分，或从抗体天然存在或天然产生的组织或细胞中分离或除去的抗体是用于本发明的目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包含重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案，分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学品。

[0095] 本发明包含中和和/或阻断抗激活素A抗体。如本文所用，“中和”或“阻断”抗体旨在指其与激活素A的结合起到以下作用的抗体：(i) 干扰激活素A与激活素A受体（例如，激活素IIA型受体、激活素IIB型受体、激活素I型受体等）之间的相互作用；(ii) 干扰激活素-激活素受体复合物的形成；和/或(iii) 导致激活素A的至少一种生物功能的抑制。由激活素A中和或阻断抗体引起的抑制不需要是完全的，只要其可使用合适的测定法可检出即可。用于检测激活素A抑制的示例性测定法描述于本文的工作实施例中。

[0096] 如与衍生抗体的对应种系序列相比，本文所公开的抗激活素A抗体可以在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较，可以容易地确定此类突变。本发明包含衍生自本文所公开的任何氨基酸序列的抗体和其抗原结合片段，其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为另一种人种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为一个或多个对应的种系残基的保守氨基酸取代（此类序列变化在本文中统称为“种系突变”）。从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始，本领域普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个个体种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中， V_H 结构域和/或 V_L 结构域内的框架和/或CDR残基的全部突变回在衍生抗体的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施方案中，仅将某些残基突变回原始种系序列，例如，仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基，或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。在其它实施方案中，一个或多个框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列（即，与最初衍生抗体的种系序列不同的种系序列）的一个或多个对应的残基。此外，本发明的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合，例如其中某些个体残基突变为特定种系序列的对应残基，而与原始种系序列不同的某些其它残基可以维持或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得，可容易地检测含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段的一种或多种所期望的特性，如经改善的结合特异性、增加的结合亲和力、经改善或增强的拮抗或激动的生物学特性（视情况而定）、降低的免疫原性等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0097] 本发明还包括抗激活素A抗体，其包含具有一个或多个保守取代的本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个的变体。例如，本发明包括具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗激活素A抗体，相对于本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个，HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如，10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0098] 术语“表位”是指与被称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可以具有多于一个表位。因此，不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合，并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下，表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0099] 当提及核酸或其片段时，术语“基本同一性”或“基本上相同”表示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一个核酸(或其互补链)进行最佳比对时，核苷酸序列同一性为核苷酸碱基的至少约95%，并且更优选地，至少约96%、97%、98%或99%，如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法所测量的，如以下所讨论的。在某些情况下，具有与参考核酸分子基本同一性的核酸分子可以编码具有与由参考核酸分子编码的多肽相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。

[0100] 当应用于多肽时，术语“基本相似性”或“基本上类似”意指当如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时，两个肽序列共享至少95%的序列同一性，甚至更优选地，至少98%或99%的序列同一性。优选地，不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有化学特性(例如，电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。总体而言，保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下，可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度，以校正取代的保守性质。作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如，Pearson, W. R., *Methods Mol Biol*, 第24卷: 第307-331页, 1994年, 以引用方式并入本文。具有相似化学性质的侧链的氨基酸的组的示例包括(1)脂肪族侧链: 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; (2)脂肪族-羟基侧链: 丝氨酸和苏氨酸; (3)含酰胺的侧链: 天冬酰胺和谷氨酰胺; (4)芳香族侧链: 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; (5)碱性侧链: 赖氨酸、精氨酸和组氨酸; (6)酸性侧链: 天冬氨酸和谷氨酸, 并且(7)含硫侧链是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基是: 缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地, 保守替代是在以引用方式并入本文的Gonnet等人, *Science*, 第256卷: 第1443-1445页, 1992年中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0101] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性, 也被称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰(包含保守氨基酸取代)的类似性的度量来匹配类似的序列。例如, GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序, 所述程序可以与默认参数一起使用, 以确定紧密相关的多肽, 如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如, 6.1版GCG。还可以使用使用默认或推荐的参数的FASTA来比较多肽序列, 所述FASTA为6.1版GCG中的程序。FASTA(例如, FASTA2和FASTA3)提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(参见例如, Pearson, W. R., *Methods Mol Biol*, 第132卷: 第185-219页, 2000年, 以引用方式并入本文。)。当比较本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库时, 另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST, 尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如, Altschul等人, *J Mol Biol*, 第215卷: 第403-410页, 1990年, 以及Altschul等人, *Nucleic*

Acids Res,第25卷:第3389-3402页,1997年,这些文献各自以引用方式并入本文。

[0102] 本发明提供了包含重链可变区 (HCVR) 的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区 (HCVR) 具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、82、98、106、114、122、130、138、154、162、170、178、186、194、和202,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列。

[0103] 本发明还提供了包含轻链可变区 (LCVR) 的抗体或抗体的抗原结合片段,该轻链可变区具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、146、和210,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列。

[0104] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含选自以下的HCVR和LCVR (HCVR/LCVR) 序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。

[0105] 本发明还提供了抗体或抗体的抗原结合片段,其包含重链CDR3 (HCDR3) 结构域,该结构域具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、24、40、56、72、88、104、112、120、128、136、144、160、168、176、184、192、200、和208,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列;以及轻链CDR3 (LCDR3) 结构域,该结构域具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、32、48、64、80、96、152、和216,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列。

[0106] 在某些实施方案中,抗体或抗体的抗原结合部分包含选自以下的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对:SEQ ID NO:8/16、24/32、40/48、56/64、72/80、88/96、104/96、112/96、120/96、128/96、136/96、144/152、160/152、168/152、176/152、184/152、192/152、200/152、和208/216。

[0107] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其还包含重链CDR1 (HCDR1) 结构域,该结构域具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、20、36、52、68、84、100、108、116、124、132、140、156、164、172、180、188、196、和204,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列;重链CDR2 (HCDR2) 结构域,该结构域具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、22、38、54、70、86、102、110、118、126、134、142、158、166、174、182、190、198、和206,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列;轻链CDR1 (LCDR1) 结构域,该结构域具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、28、44、60、76、92、148、和212,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列;以及轻链CDR2 (LCDR2) 结构域,该结构域具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、30、46、62、78、94、150、和214,或者其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本上类似的序列。

[0108] 本发明的某些非限制性示例性抗体和抗原结合片段分别包括HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16 (例如,H4H10423P);20-22-24-28-30-32 (例如H4H10424P);36-38-40-44-46-48 (例如H4H10426P);52-54-56-60-62-64 (例如H4H10429P);68-70-72-76-78-80 (例如H4H10430P);84-86-88-92-94-96 (例如H4H10432P2);100-102-104-92-94-96 (例如H4H10433P2);108-110-112-92-94-96 (例如H4H10436P2);116-118-120-92-94-96 (例如H4H10437P2);124-

126-128-92-94-96 (例如H4H10438P2); 132-134-136-92-94-96 (例如H4H10440P2); 140-142-144-148-150-152 (例如H4H10442P2); 156-158-160-148-150-152 (H4H10445P2); 164-166-168-148-150-152 (H4H10446P2); 172-174-176-148-150-152 (H4H10447P2); 180-182-184-148-150-152 (H4H10448P2); 188-190-192-148-150-152 (H4H10452P2); 196-198-200-148-150-152 (H4H10468P2); 以及204-206-208-212-214-216 (H2aM10965N)。在一些实施方案中,抗激活素A抗体包含上述CDR序列和HCVR和/或LCVR,该HCVR和/或LCVR与选自SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210的相应HCVR和LCVR (HCVR/LCVR)序列对至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0109] 在一些实施方案中,本发明包括特异性结合激活素A的抗体或抗体的抗原结合片段,其中抗体或片段包含在重链和轻链可变区 (HCVR/LCVR) 序列内包含的重链和轻链CDR结构域,该重链和轻链可变区 (HCVR/LCVR) 序列选自SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/90、106/90、114/90、122/90、130/90、138/146、154/146、162/146、170/146、178/146、186/146、194/146、和202/210。用于识别HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域熟知的,并且可以用于识别本文公开的特定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可以用于识别CDR的边界的示例性规约包含例如,Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般而言,Kabat定义基于序列可变性,Chothia定义基于结构环区域的位置,并且AbM定义是Kabat方式与Chothia方式之间的折衷。参见例如,Kabat,“具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”,国立卫生研究院,贝塞斯达(Bethesda),马里兰州,1991年;Al-Lazikani等人,J Mol Biol,第273卷:第927-948页,1997年;以及Martin等人,PNAS (USA),第86卷:第9268-9272页,1989年。公共数据库也可用于识别抗体内的CDR序列。

[0110] 本发明包括具有改变的碳水化合物含量的抗激活素A抗体。在一些应用中,去除不期望的糖基化位点的修饰可能是有用的。在一些应用中,可使用修饰以修改糖基化模式,例如修饰抗体以使寡糖链上出现缺乏岩藻糖的部分,从而增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等人,J Biol Chem 277:26733(2002))。在其它应用中,可以进行半乳糖基化的修饰,以修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些应用中,抗体可具有修饰的糖基化模式以使效应子功能最小化。例如,可修饰抗体以获得额外糖基化或唾液酸化的抗体。

[0111] 抗体的生物学特性

[0112] 本发明包含以高亲和力结合激活素A的抗激活素A抗体及其抗原结合片段。例如,本发明包括抗体和抗体的抗原结合片段,例如使用本文实施例中限定的测定形式,通过表面等离子共振测量的其以小于约30nM的 K_D 结合激活素A(例如,在25°C或37°C下)。在某些实施方案中,例如使用本文实施例3中限定的测定形式或基本上相似的测定,通过表面等离子共振测量,本发明的抗体或抗原结合片段以小于约25nM、小于约20nM、小于约15nM、小于约10nM、小于约5nM、小于约2nM、小于约1nM、小于约500pM、小于约250pM、小于约240pM、小于约230pM、小于约220pM、小于约210pM、小于约200pM、小于约190pM、小于约180pM、小于约170pM、小于约160pM、小于约150pM、小于约140pM、小于约130pM、小于约120pM、小于约110pM、小于约100pM、小于约95pM、小于约90pM、小于约85pM、小于约80pM、小于约75pM、小于约70pM、小于约65pM、小于约60pM、小于约55pM、小于约50pM、小于约45pM、小于约40pM、小于

约35pM、小于约30pM、小于约25pM、小于约20pM、小于约15pM、小于约10pM、小于约9pM、小于约8pM、小于约7pM、小于约6pM、小于约5pM、小于约4pM、或小于约3pM的 K_D 结合激活素A。

[0113] 本发明还包括抑制激活素A介导的细胞信号转导的抗激活素A抗体及其抗原结合片段。例如,本发明包括通过激活素A与激活素I型或II型受体的结合抑制SMAD复合物信号转导途径的激活的抗激活素A抗体,例如使用本文实施例中限定的测定形式或基本上相似的测定,通过基于细胞的阻断生物测定法测量的其 IC_{50} 值小于约4nM。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段通过激活素A与激活素I型或II型受体的结合来抑制SMAD复合物信号转导途径的激活,例如使用本文实施例中限定的测定形式或基本上相似的测定,通过基于细胞的阻断生物测定法测量的其 IC_{50} 值小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM、小于约500pM、小于约250pM、小于约240pM、小于约230pM、小于约220pM、小于约210pM、小于约200pM、小于约190pM、小于约180pM、小于约170pM、小于约160pM、小于约150pM、小于约140pM、小于约130pM、小于约120pM、小于约110pM、小于约100pM、小于约95pM、小于约90pM、小于约85pM、小于约80pM、小于约75pM、小于70pM、小于约65pM、小于约60pM、小于约55pM、小于约50pM、小于约49pM、小于约48pM、小于约47pM、小于约46pM、小于约45pM、小于约44pM、小于约43pM、小于约42pM、小于约41pM、小于约40pM、或小于约39pM。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段通过干扰激活素B与激活素I型或II型受体的结合来抑制激活素B的信号转导的激活,例如使用本文实施例中限定的测定形式或基本上相似的测定,通过基于细胞的阻断生物测定法测量的其 IC_{50} 值小于约50nM、小于约20nM、小于约10nm、小于约5nM或小于约1nM。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段通过激活素AB与激活素I型或II型受体的结合来抑制SMAD复合物信号转导途径的激活,例如使用本文实施例中限定的测定形式或基本上相似的测定,通过基于细胞的阻断生物测定法测量的其 IC_{50} 值小于约500pM、小于约450pM、小于约440pM、小于约430pM、小于约420pM、小于约410pM、小于约400pM、小于约390pM、小于约380pM、小于约370pM、小于约360pM、小于约350pM、小于约340pM、小于约320pM、小于约310pM、小于约300pM、小于约290pM、小于约280pM、小于约270pM、小于约260pM、小于约250pM、小于约240pM、小于约230pM、小于约220pM、小于约210pM、小于约200pM、小于约190pM、小于约180pM、小于约170pM、小于约160pM、小于约150pM、或小于约140pM。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段通过激活素AC与激活素I型或II型受体的结合来抑制SMAD复合物信号转导途径的激活,例如使用本文实施例中限定的测定形式或基本上相似的测定,通过基于细胞的阻断生物测定法测量的其 IC_{50} 值小于约1nM、小于约900pM、小于约800pM、小于约750pM、小于约700pM、小于约650pM、小于约600pM或小于约580pM。

[0114] 本发明的抗体可以具有前述生物学特性或其任何组合中的一种或多种。通过阅读本公开,包括本文的工作实施例,本发明抗体的其他生物学特性对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0115] 包括Fc变体的抗激活素A抗体

[0116] 根据本发明的某些实施方案,提供了包含Fc结构域的抗激活素A抗体,该Fc结构域包含例如如与中性pH相比在酸性pH下增强或减弱抗体与FcRn受体的结合的一个或多个突变。例如,本发明包含在Fc结构域的 C_H2 区或 C_H3 区中包括突变的抗激活素A抗体,其中一个或多个突变增加Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5至约6.0的核内体中)对FcRn

的亲合力。当施用于动物时,此类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性示例包括,例如,位置250处的修饰(例如,E或Q);位置250和428处的修饰(例如,L或F);位置252处的修饰(例如,L/Y/F/W或T)、位置254处的修饰(例如,S或T)和位置256处的修饰(例如,S/R/Q/E/D或T);或位置428和/或433处的修饰(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或位置434处的修饰(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y]);或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308处的修饰(例如,308F、V308F)和位置434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如,M428L)和/或434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。在另一个实施方案中,修饰包括265A(例如,D265A)和/或297A(例如,N297A)修饰。

[0117] 例如,本发明包括抗激活素A抗体,其包含Fc结构域,该Fc结构域包含选自以下的一对或多对突变或一组或多组突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);257I和311I(例如,P257I和Q311I);257I和434H(例如,P257I和N434H);376V和434H(例如,D376V和N434H);307A、380A和434A(例如,T307A、E380A和N434A);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。前述Fc结构域突变的所有可能的组合和本文公开的抗体可变结构域内的其它突变都在本发明的范围内。

[0118] 本发明还包括抗激活素A抗体,其包含和嵌合重链恒定(CH)区,其中嵌合CH区包含衍生自多于一种免疫球蛋白同种型的CH区的区段。例如,本发明的抗体可包含嵌合CH区,其包含衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子、与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子的CH3结构域的一部分或全部组合的CH2结构域的一部分或全部。根据某些实施方案,本发明的抗体包括具有嵌合铰链区的嵌合CH区。例如,嵌合铰链可以包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号来自位置216到227位的氨基酸残基),其与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列(根据EU编号来自位置228到236位的氨基酸残基)相结合。根据某些实施方案,嵌合铰链区包括衍生自人IgG1或人IgG4上铰链的氨基酸残基和衍生自人IgG2下铰链的氨基酸残基。在某些实施方案中,包括本文所述的嵌合CH区的抗体可以表现出不会不利地影响抗体的治疗或药代动力学性质的经过修饰的Fc效应子功能。(参见,例如美国临时申请号61/759,578,提交于2013年2月1日,其公开内容全文以引用方式并入本文)。

[0119] 表位作图和相关技术

[0120] 本发明包括抗激活素A抗体,其与激活素A内(例如在激活素II型受体结合位点内)发现的一个或多个氨基酸相互作用。抗体结合的表位可由位于激活素BA亚基内的3个或更多个(例如,3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)氨基酸的单一连续序列组成。可替代地,该表位可由激活素A二聚体内的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。

[0121] 可使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定抗体是否是多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如,常规交叉阻断测定(如在Antibodies、Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harb.,NY)中描述

的交叉阻断测定)、丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke, *Methods Mol Biol*, 第248卷:第443-463页, 2004年)和肽切割分析。另外,可采用方法诸如表位切除、表位提取及抗原的化学修饰等(Tomer, *Protein Science*, 第9卷:第487-496页, 2000年)。可以用于鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对感兴趣的蛋白质进行氘标记,然后将抗体与氘标记的蛋白质结合。接下来,将蛋白质/抗体复合物转移到水中,以允许在除抗体保护的残基(其保持为经氘标记的)之外的所有残基处发生氢-氘交换。在解离抗体后,对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析,从而揭示对应于与抗体相互作用的特定氨基酸的经氘标记的残基。参见例如, Ehring, *Analytical Biochemistry*, 第267卷第2期:第252-259页, 1999年; Engen和Smith, *Anal. Chem.* 第73卷:第256A-265A页, 2001年。

[0122] 本发明还包括结合到与本文所述的任何特定示例性抗体相同的表位上的抗激活素A抗体(例如, H4H10423P、H4H10424P、H4H10426P、H4H10429P、H4H10430P、H4H10432P2、H4H10433P2、H4H10436P2、H4H10437P2、H4H10438P2、H4H10440P2、H4H10442P2、H4H10445P2、H4H10446P2、H4H10447P2、H4H10448P2、H4H10452P2、H4H10468P2、H2aM10965N等)。同样地,本发明还包括与本文所述的任何特定示例性抗体竞争与激活素A的结合的抗激活素A抗体(例如, H4H10423P、H4H10424P、H4H10426P、H4H10429P、H4H10430P、H4H10432P2、H4H10433P2、H4H10436P2、H4H10437P2、H4H10438P2、H4H10440P2、H4H10442P2、H4H10445P2、H4H10446P2、H4H10447P2、H4H10448P2、H4H10452P2、H4H10468P2、H2aM10965N等)。例如,本发明包括与一种或多种抗体(例如, H4H10423P、H4H10446P2、H4H10468P2和H4H10442P2)交叉竞争与激活素A的结合的抗激活素A抗体。本发明还包括与一种或多种抗体(例如, H4H10429、H4H1430P、H4H10432P2、H4H10436P2、和H4H10440P2)交叉竞争与激活素A的结合的抗激活素A抗体。

[0123] 通过使用本领域已知的和本文举例说明的常规方法,可以容易地确定抗体是否结合与参考抗激活素A抗体相同的表位或竞争结合参考抗激活素A抗体。例如,为了确定测试抗体是否结合与本发明的参考抗激活素A抗体相同的表位,允许参考抗体结合激活素A(或包含 β A亚基的异源二聚体)。接下来,评估测试抗体结合到激活素A的能力。如果测试抗体能够在与参考抗激活素A抗体饱和结合后结合激活素A,则可以得出结论,测试抗体结合与参考抗激活素A抗体不同的表位。另一方面,如果测试抗体在与参考抗激活素A抗体饱和结合后不能够结合激活素A,则测试抗体可以结合与由本发明的参考抗激活素A抗体限定的表位相同的表位。然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认所观察到的测试抗体的结合缺乏是否实际上是由于结合与参考抗体相同的表位或者是否是空间阻断(或其它现象)导致所观察到的结合缺乏。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域可获得的任何其它定量或定性抗体结合测定来进行这种实验。根据本发明的某些实施方案,如果例如,一种抗体的1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量将另一种抗体的结合抑制至少50%,但是优选地75%、90%或甚至99%,则两个抗体结合到同一(或重叠)表位,如在竞争性结合测定中所测量(参见例如, Junghans等人, *Cancer Res.*, 第50卷:第1495-1502页, 1990年)。可替代地,如果抗原中基本上所有减少或消除一种抗体的结合的氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则认为两种抗体结合到同一表位。如果仅减少或消除一种抗体的结合的氨基酸突变的子集减少或消除另一种抗体的结合,则认为两种抗体具有“重叠表

位”。

[0124] 为了确定抗体是否与参考抗激活素A抗体竞争结合(或交叉竞争结合),上述结合方法以两种定向进行:在第一种定向中,允许参考抗体在饱和条件下结合激活素A蛋白(或包含BA亚基的异源二聚体),随后评估测试抗体与激活素A分子的结合。在第二种定向中,使测试抗体在饱和条件下结合激活素A,然后评估参考抗体与激活素A的结合。如果在两种定向中,只有第一(饱和)抗体能够结合激活素A,则推断测试抗体和参考抗体竞争与激活素A的结合。如本领域的普通技术人员将理解的,与参考抗体竞争结合的抗体可能不一定结合与参考抗体相同的表位,而是可以通过结合重叠或相邻的表位而在空间上阻断参考抗体的结合。

[0125] 本发明的抗激活素A抗体可结合到激活素A的表位上(该表位在激活素II型受体结合位点内或其附近),直接阻断激活素A与激活素II型受体之间的相互作用,并间接阻断激活素A与激活素I型受体之间的相互作用。本发明的抗激活素A抗体可结合到激活素A的表位上(该表位在激活素I型受体结合位点内或其附近)并直接阻断激活素A与激活素I型受体之间的相互作用。在本发明的一个实施方案中,在激活素I型受体结合位点处或其附近结合激活素A的本发明的抗激活素A抗体不阻断激活素A与激活素A II型受体之间的相互作用。

[0126] 人抗体的制备

[0127] 用于产生单克隆抗体(包括完全人单克隆抗体)的方法是本领域已知的。可将任何此类已知方法用于本发明中用于制备与人激活素A特异性结合的人抗体的上下文。

[0128] 例如,使用VELOCIMMUNE™技术或用于产生完全人单克隆抗体的任何其他已知方法,最初分离具有人可变区和小鼠恒定区的人激活素A的高亲和力嵌合抗体。如在下文实验部分中,对抗体进行表征并选择期望的特性,包括亲和力、选择性、表位等。如果需要的话,用期望的人恒定区(例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4)替代小鼠恒定区,以产生完全人抗激活素A抗体。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特性存在于可变区中。在某些情况下,完全人抗激活素A抗体直接从抗原阳性B细胞中分离。

[0129] 生物等效物

[0130] 本发明的抗激活素A抗体和抗体片段包含具有与所述抗体的氨基酸序列不同、但保留结合人激活素A的能力的氨基酸序列的蛋白。当与亲本序列比较时,此类变体抗体和抗体片段包含氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但表现出与所述抗体基本上等同的生物活性。同样地,当与所公开的序列比较时,本发明的编码抗激活素A抗体的DNA序列涵盖包含核苷酸的一个或多个添加、缺失或取代的序列,但编码与本发明的抗激活素A抗体或抗体片段基本上生物等效的抗激活素A抗体或抗体片段。上文讨论了此类变体氨基酸和DNA序列的示例。

[0131] 如果例如,两种抗原结合蛋白或抗体是在相似的实验条件下以相同的摩尔剂量施用(单次剂量或多次剂量)时吸收速率和吸收程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,则认为所述两种抗原结合蛋白或抗体是生物等效的。如果一些抗体在其吸收程度上等效但在其吸收速率上不等效,则认为所述抗体是等效物或药物替代物,并且可以认为所述抗体是生物等效的,因为有意并且反映在标记上的这种吸收速率差异在例如长期使用对于达到有效的身体药物浓度并非是必需的并且对于所研究的特定药物产品而言被认

为是医学上无关紧要的。

[0132] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力不存在临床上有意義的差异,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0133] 在一个实施方案中,与不存在参考产品和生物产品之间的转换的持续治疗相比,如果患者可以在参考产品和生物产品之间转换一次或多次而没有预期的副作用风险增加(包含免疫原性的临床显著变化或有效性降低),则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0134] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白均通过针对一个或多个使用条件的一种或多种共同作用机制起作用(只要这些机制是已知的),则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0135] 生物等效性可以通过体内和体外方法来证明。生物等效性测量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量血液、血浆、血清或其他生物流体中抗体或其代谢物的浓度作为时间的函数;(b)与人体内生物利用度数据相关并能合理预测人体内生物利用度数据的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中进行的体内试验,其中抗体(或其靶标)的适当急性药理学效果作为时间函数进行测量;以及(d)在建立抗体的安全性、疗效或生物利用度或生物等效性的良好控制的临床试验中。

[0136] 可通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失非生物活性所必需的末端或内部残基或序列来构建本发明的抗激活素A抗体的生物等效变体。例如,可以缺失非生物活性所必需的半胱氨酸残基或用其它氨基酸替代,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫键。在其他情况下,生物等效抗体可包括抗激活素A抗体变体,这些抗激活素A抗体变体包含修饰抗体的糖基化特性的氨基酸变化,例如消除或去除糖基化的突变。

[0137] 物种选择性和物种交叉反应性

[0138] 根据某些实施方案,本发明提供了与人激活素A结合但不与来自其他物种的激活素A结合的抗激活素A抗体。本发明还包括与人激活素A和来自一个或多个非人物种的激活素A结合的抗激活素A抗体。例如,本发明的抗激活素A抗体可以结合人激活素A,并且根据具体情况可以结合或不结合小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨、恒河猴或黑猩猩激活素A中的一种或多种。根据本发明的某些示例性实施方案,提供了抗激活素A抗体,其特异性结合人激活素A(例如、激活素A或含BA亚基的异源二聚体)和食蟹猴(例如食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*))激活素A。

[0139] 多特异性抗体

[0140] 本发明的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对多于一种的靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见例如Tutt等人., *J Immunol* 147:60-69 (1991); Kufer等人, *Trends Biotechnol* 22:238-244 (2004)。本发明的抗激活素A抗体可以与另一种功能分子(例如,另一种肽或蛋白质)连接或共表达。例如,抗体或其片段可以与一个或多个其他分子实体如另一个抗体或抗体片段功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其他方式),以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。例如,本发明包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂对人激活素A或其片段具有特异性,并且免疫球蛋白的另一个臂对第二治疗靶标具有特异性或与治疗部分缀合。本发明的一个实施方案包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂对人激活素A或其片段是特异性的,并且免疫球蛋白的另

一个臂对GDF8是特异性的。

[0141] 可在本发明上下文中使用的示例性双特异性抗体形式涉及使用第一免疫球蛋白(Ig)_H3结构域和第二Ig_H3结构域,其中第一和第二Ig_H3结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比,至少一个氨基酸差异降低了双特异性抗体与蛋白A的结合(参见例如美国专利8,586,713,其全文以引用方式并入本文)。在一个实施方案中,第一Ig_H3结构域结合蛋白A,并且第二Ig_H3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;H435R,通过EU编号)。第二C_H3可以进一步包括Y96F修饰(通过IMGT;Y436F,通过EU)。可存在于第二C_H3内的其他修饰包括:D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(IMGT;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I,EU),在IgG1抗体的情况下;N44S、K52N和V82I(IMGT;N384S、K392N和V422I,EU),在IgG2抗体的情况下;和Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、V82I和L105P(IMGT;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、V422I和L445P,EU),在IgG4抗体的情况下。在本发明的范围内考虑上述双特异性抗体形式的变化。

[0142] 可以在本发明的背景下使用的其他示例性双特异性形式包含但不限于以下形式:例如,基于scFv的或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变结构域(DVD)-Ig、四杂交瘤(Quadroma)、结节入孔(knobs-into-holes)、共同轻链(例如,具有旋钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED) body、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG以及Mab²双特异性形式(参见例如,Klein等人,mAbs 4:6,1-11(2012),以及其中引用的参考文献,用于回顾前述格式)。还可以使用肽/核酸缀合构建双特异性抗体,例如,其中具有正交化学反应性的非天然氨基酸用于产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后其自组装成具有确定组成,化合价和几何形状的多聚体复合物。(参见例如Kazane等人,J Am Chem Soc.135(1):340-346(2013))。

[0143] 治疗性制剂和施用

[0144] 在本发明的方法中使用的抗激活素A抗体(或其他激活素A特异性拮抗剂)可被配制成与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂一起施用的药物组合物。这些药物组合物与合适的载体、赋形剂和提供经改善的转移、递送、耐受性等或其他药剂一起配制。在所有药物化学家已知的处方集中可以找到许多适当的制剂:《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company,Easton,PA)。这些制剂包含例如,粉末、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子或阴离子)(如LIPOFECTINTM,生命科技(Life Technologies),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有聚乙二醇的半固体混合物。还参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”,PDA,J Pharm Sci Technol,第52卷:第238-311页,1998年。

[0145] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、病症、给药途径等而变化。通常根据体重或体表面积计算优选的剂量。当本发明的抗体用于治疗成年患者与激活素A活性相关联的病症或疾病时,通常以约0.01mg/kg至约20mg/kg体重、更优选地约0.02mg/kg至约7mg/kg体重、约0.03mg/kg至约5mg/kg体重或约0.05mg/kg至约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明的抗体可能是有利的。在一些情况下,剂量为3mg/

kg。在一些情况下,剂量为10mg/kg。根据病状的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。患有“严重”疾病(例如,COVID-19)的患者需要通过鼻插管、简单的面罩或其他类似的供氧装置进行辅助氧气吸入术。患有“危急”疾病(例如,COVID-19)的患者需要通过高流量鼻插管的非再呼吸面罩或使用有创通气或无创通气来输送补充氧气、或者需要在重症监护病房中治疗。施用抗激活素A抗体的有效剂量和方案可凭经验确定;例如,可通过定期评估来监测患者的进展,并相应地调整剂量。此外,剂量的种间缩放可以使用本领域熟知的方法进行(例如,Mordenti等人,Pharmaceut Res,第8卷:第1351页,1991年)。

[0146] 各种递送系统是已知的并且可用于施用本发明的药物组合物,例如,在脂质体、微粒、微胶囊内包封、能够表达本发明的抗体或其他治疗性蛋白的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如,Wu等人,J Biol Chem,第262卷:第4429-4432页,1987年)。本发明的抗体和其他治疗活性组分也可通过基因疗法技术递送。引入的方法包含但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用组合物,例如通过输注或快速浓注、通过上皮或皮肤粘膜内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收,并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。

[0147] 可用标准针头和注射器皮下或静脉内递送药物组合物。另外,就皮下递送而言,笔递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦已经施用了药筒内的全部药物组合物,并且药筒是空的,就可以轻易地丢弃空药筒,并且用含有药物组合物的新药筒更换。然后可以重复使用笔递送装置。在一次性笔递送装置中,没有可更换的药筒。相反,一次性笔递送装置预装有固持在装置内的贮存器中的药物组合物。一旦贮存器中的药物组合物清空,就丢弃整个装置。

[0148] 许多可重复使用的笔递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本文讨论的药物组合物。示例包含但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford公司(Owen Mumford, Inc.),伍德斯托克,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,波道夫,瑞士)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(礼来公司(Eli Lilly and Co.),印第安纳波利斯,印第安纳州)、NOVOPEN™I、II和III(诺和诺德(Novo Nordisk),哥本哈根,丹麦)、NOVOPEN JUNIOR™(诺和诺德,哥本哈根,丹麦)、BD™笔(贝迪医疗(Becton Dickinson),富兰克林湖,新泽西州)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及OPTICLIK™(赛诺菲(sanofi-aventis),法兰克福市,德国),仅举几例。应用于皮下递送的本发明的药物组合物的一次性笔递送装置的示例包含但不限于SOLOSTAR™笔(赛诺菲)、FLEXPEN™(诺和诺德(Novo Nordisk))以及KWIKPEN™(礼来(Eli Lilly))、SURECLICK™自动注射器(加利福尼亚州的千橡市安进公司(Amgen, Thousand Oaks, CA))、PENLET™(德国斯图加特的Haselmeier公司(Haselmeier, Stuttgart, Germany))、EPIPEN(Dey公司(Dey, L.P.))以及HUMIRA™笔(伊利诺伊州雅培科技园的雅培实验室(Abbott Labs, Abbott Park IL)),仅举几例。

[0149] 在某些情况下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施方案中,可使用泵(参见Langer,同上;Sefton,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.,第14卷:第201页,1987年)。在另一个实施方案中,可使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),1974年,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又一个实施方案中,控释系统可以放置在组合物靶标附近,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见例

如,Goodson,1984,《控释医学应用》,同上,第2卷,第115-138页)。其他受控释放系统在以下综述中讨论:Langer,Science,第249卷:第1527-1533页,1990年。

[0150] 可注射制剂可以包含用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。可以通过已知的方法制备这些可注射制剂。例如,可以例如通过将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制备可注射制剂。作为注射用水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂的等渗溶液。

[0151] 组合疗法

[0152] 本发明包括使用或施用本文所述的任何抗激活素A抗体与一种或多种另外的治疗活性组分组合的方法。在一些情况下,本发明的抗激活素A抗体还可与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇、类固醇、氧、抗氧化剂、金属螯合剂、IFN- γ 和/或NSAID组合施用和/或共同配制。在一些情况下,本发明的抗激活素A抗体还可与用于治疗、预防或降低心力衰竭的严重程度或心力衰竭的一种或多种并发症的另外的活性剂或其他支持性疗法组合施用或使用。在一些情况下,其他活性剂或其他支持性疗法选自:起搏器、可植入心脏除颤器、心肌收缩性调节、心脏再同步治疗术、心室辅助装置、双心室心脏再同步治疗术、心脏移植、肾上腺素能阻断剂(α -和 β -阻断剂)、中枢作用 α -激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性肌力药、血管扩张剂、苯二氮平类药物、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、多种利尿剂、卡托普利、依那普利、赖诺普利、贝那普利、雷米普利、佐芬普利、喹那普利、培哌普利、赖诺普利、贝那普利、咪达普利、群多普利、西拉普利、和福辛普利、洛沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、厄贝沙坦、替米沙坦、依普罗沙坦、奥美沙坦、阿齐沙坦、非马沙坦、普萘洛尔、布奇诺尔、卡替洛尔、卡维地洛、拉贝洛尔、纳多洛儿、氧烯洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、索他洛尔、噻吗洛尔、醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、塞利洛尔、艾司洛尔、美托洛尔、奈比洛尔、布他拉胺、ICI-118,551、SR 59230A、苯氧苄胺、酚妥拉明、妥拉唑啉、曲唑酮、阿夫唑嗪、甲磺酸多沙唑嗪(Cardura和Carduran)、哌唑嗪、坦索罗辛、特拉唑嗪、西洛多辛、阿替美唑(例如安醒顺(Antisedan))、咪唑克生、米氮平、育亨宾、酸化盐(例如 CaCl_2 和 NH_4Cl)、精氨酸加压素受体2拮抗剂、选择性血管加压素V2拮抗剂、Na-H交换剂拮抗剂、碳酸酐酶抑制剂、髓祥利尿药、渗透性利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪类、黄嘌呤类、二氢吡啶、氨氯地平、阿雷地平、阿折地平、巴尼地平、贝尼地平、西尼地平、氯维地平、依拉地平、依福地平、非洛地平、拉西地平、乐卡地平、马尼地平、尼卡地平、硝苯地平、硝苯地平、尼伐地平、尼莫地平、尼索地平、尼群地平、普拉地平、苯基烷基胺钙通道阻断剂、维拉帕米、加洛帕米、芬地林、苯并硫氮杂卓钙通道阻断剂、地尔硫卓、米贝拉地尔、苜普地尔、氟桂利嗪、氟司必林、芬地林、加巴喷丁类似物、齐考诺肽、地高辛、胺碘酮、黄连素、左西孟旦、omecamtiv、儿茶酚胺、类二十烷酸、磷酸二酯酶抑制剂、依诺昔酮、米力农、氨利酮、茶碱、胰高血糖素、胰岛素、硝普钠、胍屈嗪、二硝酸异山梨酯、和单硝酸异山梨酯、硝酸甘油、苯二氮平类药物、肾素抑制剂、可乐定、胍那苄、胍法辛、甲基多巴、和莫索尼定、米诺地尔、胍乙啶、美加明、利血平、不可逆环加氧酶抑制剂、二磷酸腺苷受体抑制剂、氯吡格雷、普拉格雷、替格瑞洛、和噻氯匹定、磷酸二酯酶抑制剂、西洛他唑、蛋白酶激活受体-1拮抗剂、沃拉帕沙、糖蛋白抑制剂、阿昔单抗、埃替非巴肽、替罗非班、腺苷再摄取抑制剂、双嘧达莫、血栓烷抑制剂、血栓烷合成酶抑制剂、和血栓烷受体拮抗剂、组织型纤溶酶原激活物、阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶、阿尼普酶、链激酶、尿激酶、达比加群酯、利伐沙班、阿哌沙班、香豆素、肝素及其衍生物、

因子Xa抑制剂、依度沙班、阿哌沙班、伊多塞班、贝曲沙班、利他沙班、艾巴沙班、水蛭素、来匹卢定、比卡鲁胺、阿加曲班、达比加群酯、希美加群、抗凝血酶蛋白、巴曲酶、细胞溶素、和维生素E。在一些实施方案中，本发明的任何抗激活素A抗体还可以与GDF8抑制剂(例如，抗GDF8抗体)组合施用和/或共同配制。

[0153] 另外的治疗活性组分或支持性疗法可施用给受试者或在施用本发明的抗激活素A抗体之前使用。例如，如果在施用/使用第二组分之前1周、之前72小时、之前60小时、之前48小时、之前36小时、之前24小时、之前12小时、之前6小时、之前5小时、之前4小时、之前3小时、之前2小时、之前1小时、之前30分钟、之前15分钟、之前10分钟、之前5分钟或之前不到1分钟施用/使用第一组分，则可认为第一组分在第二组分“之前”施用/使用。在其他实施方案中，另外的治疗活性组分或支持性疗法可施用给受试者或在施用本发明的抗激活素A抗体之后使用。例如，如果第一组分在第二组分施用/使用之后1分钟、之后5分钟、之后10分钟、之后15分钟、之后30分钟、之后1小时、之后2小时、之后3小时、之后4小时、之后5小时、之后6小时、之后12小时、之后24小时、之后36小时、之后48小时、之后60小时、之后72小时后施用/使用，则可认为第一组分是在第二组分“之后”施用/使用。在其他实施方案中，另外的治疗活性组分可施用给受试者或与施用本发明的抗激活素A抗体同时使用。出于本发明的目的，“同时”施用包括，例如，以单一剂型向受试者施用抗激活素A抗体和另外的治疗活性组分，或者以彼此间隔约30分钟或更短时间向受试者施用的单独剂型。如果以单独剂型施用，则每种剂型可经由相同的途径施用(例如，抗激活素A抗体和另外的治疗活性组分可静脉内、皮下、玻璃体内等施用)；另选地，每种剂型可以通过不同的途径施用(例如，抗激活素A抗体可以局部施用(例如，玻璃体内施用)，并且另外的治疗活性组分可以全身施用)。在任何情况下，出于本公开的目的，以单独剂型、以通过相同途径的单独剂型或以通过不同途径的单独剂型施用组分均被认为是“同时施用”。出于本公开的目的，施用抗激活素A抗体“之前”、“同时”或“之后”(如上文所定义的那些术语)施用另外的治疗活性组分被认为是与另外的治疗活性组分“组合”施用抗激活素A抗体)。

[0154] 本发明包括药物组合物，其中本发明的抗激活素A抗体与一种或多种如本文其他部分所描述的另外的治疗活性组分一起共同配制。

[0155] 剂量

[0156] 可施用给受试者的活性成分(例如，抗激活素A抗体、抗GDF8抗体、或与抗激活素A抗体组合施用的其他治疗剂、或特异性结合激活素A和GDF8的双特异性抗体)的量通常为治疗有效量，如本文其他地方所讨论的。

[0157] 在一些实施方案中，治疗有效量可以是约0.05mg至约600mg；例如约0.05mg、约0.1mg、约1.0mg、约1.5mg、约2.0mg、约10mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg、约150mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg、约200mg、约210mg、约220mg、约230mg、约240mg、约250mg、约260mg、约270mg、约280mg、约290mg、约300mg、约310mg、约320mg、约330mg、约340mg、约350mg、约360mg、约370mg、约380mg、约390mg、约400mg、约410mg、约420mg、约430mg、约440mg、约450mg、约460mg、约470mg、约480mg、约490mg、约500mg、约510mg、约520mg、约530mg、约540mg、约550mg、约560mg、约570mg、约580mg、约590mg、约600mg、约610mg、约620mg、约630mg、约640mg、约650mg、约660mg、约670mg、约680mg、约690mg、约700mg、约

710mg、约720mg、约730mg、约740mg、约750mg、约760mg、约770mg、约780mg、约790mg、约800mg、约810mg、约820mg、约830mg、约840mg、约850mg、约860mg、约870mg、约880mg、约890mg、约900mg、约910mg、约920mg、约930mg、约940mg、约950mg、约960mg、约970mg、约980mg、约990mg、或约1000mg的相应抗体。

[0158] 各剂量中包含的抗激活素A抗体或其他治疗剂的量可以用每千克患者体重的抗体毫克数(即,mg/kg)来表示。例如,抗激活素A、抗GDF8和/或抗激活素A/抗GDF8双特异性抗体可以以约0.0001mg/kg至约50mg/kg患者体重的剂量施用于患者(例如0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg、5.0mg/kg、5.5mg/kg、6.0mg/kg、6.5mg/kg、7.0mg/kg、7.5mg/kg、8.0mg/kg、8.5mg/kg、9.0mg/kg、9.5mg/kg、10.0mg/kg、10.5mg/kg、11.0mg/kg、11.5mg/kg、12.0mg/kg、12.5mg/kg、13.0mg/kg、13.5mg/kg、14.0mg/kg、14.5mg/kg、15.0mg/kg、15.5mg/kg、16.0mg/kg、16.5mg/kg、17.0mg/kg、17.5mg/kg、18.0mg/kg、18.5mg/kg、19.0mg/kg、19.5mg/kg、20.0mg/kg等)。

[0159] 施用方案

[0160] 根据本发明的某些实施方案,可在限定的时间段中向受试者施用多剂量的活性成分(例如,抗激活素A抗体、与抗激活素A抗体组合施用的抗GDF8抗体、包含抗激活素A抗体和本文提及的任何另外的治疗活性剂的组合的药物组合物,包括例如抗GDF8抗体、或特异性结合激活素A和GDF8的双特异性抗体)。根据本发明的这个方面的方法包括向受试者依次施用多个剂量的本发明的活性成分。如本文所使用的,“依次施用”意指每个剂量的活性成分在不同时间点施用于受试者,例如,在隔开预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)的不同日期。本发明包括这样的方法,该方法包括对患者顺序施用单一初始剂量的活性成分,随后施用一种或多种第二剂量的活性成分,并且任选地随后施用一种或多种第三剂量的活性成分。

[0161] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用活性成分(例如本发明的抗激活素A抗体)或本发明的组合疗法(例如抗激活素A抗体或抗GDF8抗体)的时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量都可含有相同量的活性成分(例如,抗激活素A抗体),但是在施用频率方面通常可能彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程期间初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中含有的活性成分(例如,抗激活素A抗体)的量彼此不同(例如,适当地调高或降低)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后是在较不频繁的基础上施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0162] 在本发明的一个示例性实施方案中,每个第二剂量和/或第三剂量在前一剂量后施用1周至26周(例如,1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2}或更多周)。如本文使用,短语“前一剂量”意指在多次施用的序列中,在没有中间剂量的情况下在序列中的下一个剂量之前施用给患者的活性成分(例如,抗激活素A抗体)的剂量。

[0163] 根据本发明的该方面的方法可包括向患者施用任何数量的第二剂量和/或第三剂

量的本发明的活性成分,例如,抗激活素A抗体。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第二剂量。在其它实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第二剂量。同样地,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第三剂量。在其它实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第三剂量。

[0164] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,每个第二剂量可以按与其他第二剂量相同的频率施用。例如,可以在前一剂量后1到2周或1到2个月对患者施用每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施方案中,每个第三剂量可以按与其它第三剂量相同的频率施用。例如,可以在前一剂量后2到12周对患者施用每个第三剂量。可替代地,对患者施用第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。施用频率也可以在医师的治疗过程中根据临床检查后个体患者的需要进行调整。

[0165] 本发明包括施用方案,其中以第一频率(例如,每周一次,每两周一次,每三周一次,每个月一次,每两个月一次等)向患者施用2至6个负荷剂量,然后在较不频繁的基础上给患者施用两次或更多次维持剂量。例如,根据本发明的这个方面,如果以每月一次的频率施用负荷剂量,则可以每六周一次,每两个月一次,每三个月一次向患者施用维持剂量,等等。)

[0166] 试剂盒

[0167] 本发明进一步提供了一种制品或试剂盒,其包括包装材料、容器和容纳在该容器内的药剂,其中该药剂包含至少一种激活素A拮抗剂(例如,抗激活素A抗体),并且其中该包装材料包括显示适应症和使用说明的标签或包装说明书(例如,使用抗激活素A抗体治疗心功能不全或心力衰竭)。

[0168] 实施例

[0169] 提出以下实施例,以向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是或接近大气压。

[0170] 实施例1. 产生针对激活素A的人抗体

[0171] 将包含激活素A蛋白(抑制素- β A二聚体)的免疫原与刺激免疫应答的助剂一起直接施用于包含编码人免疫球蛋白重链和 κ 轻链可变区的DNA的 VELOCIMMUNE[®]小鼠。通过激活素A特异性免疫测定法监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获脾细胞并使其与小鼠骨髓瘤细胞融合,以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生激活素A特异性抗体的细胞系。使用此技术获得了几种抗激活素A嵌合抗体(即,具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。以这种方式获得的示例性抗体是H2aM10965N。随后将来自嵌合抗体的人可变结构域克隆到人恒定结构域上以制备如本文所述的完全人抗激活素A抗体。

[0172] 如US 2007/0280945A1所述,直接从抗原阳性B细胞中分离出抗激活素A抗体,而不与骨髓瘤细胞融合。使用这种方法,获得了几种完全人抗激活素A抗体(即,具有人可变结构域和人恒定结构域的抗体);以这种方式产生的示例性抗体命名如下:H4H10423P、

H4H10429P、H4H10430P、H4H10432P2、H4H10440P2、H4H10442P2、H4H10436P2、和H4H10446P2。

[0173] 根据此实施例的方法产生的示例性抗激活素A抗体的某些生物学特性在下文阐述的实施例中详细描述。

[0174] 实施例2. 重链和轻链可变区氨基酸序列

[0175] 表1列出了所选抗激活素A抗体的重链和轻链可变区氨基酸序列对及其相应的抗体标识符。对应的核酸序列标识符列于表2中。

[0176] 表1:氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H10423P	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H10424P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H10426P	34	36	38	40	42	44	46	48
[0177] H4H10429P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H10430P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H10432P2	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H10433P2	98	100	102	104	90	92	94	96
H4H10436P2	106	108	110	112	90	92	94	96
H4H10437P2	114	116	118	120	90	92	94	96
H4H10438P2	122	124	126	128	90	92	94	96
H4H10440P2	130	132	134	136	90	92	94	96

[0178] WO 2022/040461A1

[0179] H4H10442P2	138	140	142	144	146	148	150	152
H4H10445P2	154	156	158	160	146	148	150	152
H4H10446P2	162	164	166	168	146	148	150	152
H4H10447P2	170	172	174	176	146	148	150	152
H4H10448P2	178	180	182	184	146	148	150	152
H4H10452P2	186	188	190	192	146	148	150	152
H4H10468P2	194	196	198	200	146	148	150	152
H2aM10965N	202	204	206	208	210	212	214	216

[0180] 表2:核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H10423P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H10424P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H10426P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H10429P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H10430P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H10432P2	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H10433P2	97	99	101	103	89	91	93	95
H4H10436P2	105	107	109	111	89	91	93	95
[0181] H4H10437P2	113	115	117	119	89	91	93	95
H4H10438P2	121	123	125	127	89	91	93	95
H4H10440P2	129	131	133	135	89	91	93	95
H4H10442P2	137	139	141	143	145	147	149	151
H4H10445P2	153	155	157	159	145	147	149	151
H4H10446P2	161	163	165	167	145	147	149	151
H4H10447P2	169	171	173	175	145	147	149	151
H4H10448P2	177	179	181	183	145	147	149	151
H4H10452P2	185	187	189	191	145	147	149	151
H4H10468P2	193	195	197	199	145	147	149	151
H2aM10965N	201	203	205	207	209	211	213	215

[0182] 抗体在本文中通常根据以下命名法命名:Fc前缀(例如“H1M”、“H2aM”、“H4H”),之后是数字标识符(例如“10423”、“10424”或“10426”,如表1和表2所示),之后是“P”、“P2”或“N”后缀。因此,根据此命名法,抗体在本文中可称为例如,“H4H10423P”、“H4H10432P2”、“H2aM10965N”等。本文使用的抗体名称上的H1M、H2M和H4H前缀指示抗体的特定Fc区同种型。例如,“H2aM”抗体具有小鼠IgG2a Fc,而“H4H”抗体具有人IgG4 Fc。如本领域普通技术人员所理解的,具有特定Fc同种型的抗体可以转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,具有小鼠IgG2a Fc的抗体可以转化为具有人IgG4的抗体等),但无论如何,由表1中所示的数字标识符指示的可变结构域(包含CDR)将保持相同,并且无论Fc结构域的性质如何,预期结合特性相同或基本相似。

[0183] 以下实施例中使用的对照构建体

[0184] 在以下实施例中包括抗激活素A对照分子用于比较目的。本文称为对照1的对照抗体是具有如US 8,309,082所述的“A1”的重链和轻链可变结构域序列的人抗激活素A抗体。对照2是在美国专利申请2012/0237521A1中作为MOR8159公开的抗人激活素受体II型B抗体(抗ActR2B mAb)。对照3是得自R&D Systems,Minneapolis,MN(目录号MAB3381)的鼠抗激活素A单克隆抗体。对照4是激活素IIB型受体-Fc融合分子(用C-末端人IgG1 Fc融合蛋白(NP_001097的E23-P133,后接Gly-Ser接头,后接C-末端人IgG1 Fc融合体)产生的可溶性激活素RIIB受体胞外结构域),其序列以SEQ ID NO:227提供。

[0185] 实施例3.通过表面等离子共振测定抗体与人激活素A的结合

[0186] 在25°C和37°C下使用实时表面等离子共振生物传感器(Biacore T200或Biacore 4000,GE Healthcare Life Sciences,Piscataway,NJ)测定抗原与所选纯化的抗人激活素A单克隆抗体的结合的结合亲和力和动力学常数。表达为小鼠Fc(前缀H2aM)或人Fc(前缀H4H)的抗体被捕获在它们相应的抗Fc传感器表面上(mAb捕获形式)。将抗激活素A抗体捕获在羊抗鼠IgG多克隆抗体(GE Healthcare,#BR-1008-38)或鼠抗人IgG单克隆抗体(GE

Healthcare, #BR-1008-39) 表面上, 该表面通过直接胺偶联至Biacore CM5传感器芯片而形成。使用HBS-EP (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 表面活性剂P20, pH 7.4) 或 PBS-P (10mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 137mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.05% 表面活性剂P20, pH 7.4) 作为运行缓冲液和样品缓冲液进行动力学实验。通过在捕获的抗体表面上注射不同浓度 (50nM至0.2nM范围内的4倍稀释液) 的激活素A (R&D Systems, #338-AC-050/CF)、激活素B (R&D Systems, #659-AB-025/CF)、激活素AB (R&D Systems, #1006-AB-005)、激活素AC (R&D Systems, #4879-AC/CF) 或抑制素E (Novus Biologicals, #H00083729-P01) 来测量抗原-抗体结合速率。监测抗体-抗原结合240秒, 同时监测缓冲液中的解离600秒。通过使用Scrubber软件2.0c版处理和拟合数据来测定动力学缔合和解离速率常数。然后根据动力学速率常数计算结合平衡解离常数 (K_D) 和解离半衰期 ($t_{1/2}$) 如下: K_D (M) = k_d/k_a 和 $t_{1/2}$ (分钟) = $[\ln 2 / (60 * k_d)]$ 。不同抗激活素A单克隆抗体的动力学结合参数如表3至表10所示。(NB = 在使用条件下未观察到结合; NT = 未测试)。

[0187] 表3: 在25°C下抗激活素A抗体与激活素A的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	激活素 A-20nM (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
H4H10423P	86.2 ± 0.7	19.4	3.33E+06	1.09E-04	3.26E-11	106.4
H4H10424P	337	82	3.14E+06	7.19E-04	2.29E-10	16
H4H10426P	81	23	1.18E+07	7.00E-04	5.95E-11	16
H4H10429P	115.2 ± 1	24.9	7.82E+06	6.39E-05	8.17E-12	180.8
H4H10430P	90.3 ± 4.2	19.4	4.75E+07	1.67E-04	3.52E-12	69
H4H10432P2	109.6 ± 1.2	20.7	1.57E+07	5.00E-05	≤ 3.18E-12	≥ 231
H4H10433P2	102	16	1.42E+07	5.77E-04	4.06E-11	20
H4H10436P2	113.6 ± 0.6	23.2	8.85E+06	1.68E-04	1.90E-11	68.7
[0188] H4H10437P2	167	30	1.58E+07	2.13E-03	1.34E-10	5
H4H10438P2	124	25	1.20E+07	5.88E-04	4.92E-11	20
H4H10440P2	79.2 ± 0.7	12.9	3.76E+06	9.28E-05	2.47E-11	124.5
H4H10442P2	139.3 ± 1	31.3	1.10E+07	5.00E-05	≤ 4.55E-12	≥ 231
H4H10445P2	149	43	2.40E+06	5.00E-05	≤ 2.08E-11	≥ 231
H4H10446P2	104.6 ± 0.7	24.1	1.29E+07	5.00E-05	≤ 3.88E-12	≥ 231
H4H10447P2	164	43	2.36E+06	5.00E-05	≤ 2.12E-11	≥ 231
H4H10448P2	244	64	4.76E+06	5.00E-05	≤ 1.05E-11	≥ 231
H4H10452P2	191	55	4.69E+06	5.00E-05	≤ 1.07E-11	≥ 231
H4H10468P2	93 ± 0.1	21.7	7.86E+06	5.00E-05	≤ 6.36E-12	≥ 231
H2aM10965N	393	76	1.48E+06	1.10E-03	7.45E-10	10
对照 1	84.7 ± 0.3	15.9	7.26E+06	9.92E-05	1.37E-11	116.4

[0189] 对于斜体的 k_d 值, 在这些实验条件下未观察到分析物的解离, 并且因此 k_d 值固定在5.0E-05s⁻¹。

[0190] 表4: 在37°C下抗激活素A抗体与激活素A的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	激活素 A-20nM (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
[0191] H4H10423P	101 ± 1.4	25.2	3.95E+06	5.00E-05	≤ 1.26E-11	≥ 231
H4H10424P	231	58	4.59E+06	3.64E-03	7.94E-10	3

	H4H10426P	71	21	1.61E+07	1.98E-03	1.23E-10	6
	H4H10429P	150.8 ± 5.3	31.4	1.33E+07	5.00E-05	≤3.75E-12	≥231
	H4H10430P	109.3 ± 1.3	25.0	3.80E+07	1.51E-04	3.97E-12	76.5
	H4H10432P2	141.8 ± 1.6	25.1	2.30E+07	5.00E-05	≤2.18E-12	≥231
	H4H10433P2	85	12	2.00E+07	1.07E-03	5.37E-11	11
	H4H10436P2	139.8 ± 1.4	29.4	1.49E+07	5.00E-05	≤3.35E-12	≥231
	H4H10437P2	115	20	2.04E+07	4.68E-03	2.29E-10	2
	H4H10438P2	99	18	1.87E+07	2.38E-03	1.27E-10	5
[0192]	H4H10440P2	98.6 ± 1.1	15.3	6.37E+06	3.28E-04	5.15E-11	35.2
	H4H10442P2	181 ± 2.5	40.5	1.44E+07	5.00E-05	≤3.48E-12	≥231
	H4H10445P2	120	36	4.33E+06	5.00E-05	≤ 1.15E-11	≥231
	H4H10446P2	137.2 ± 1.7	31.5	1.54E+07	5.00E-05	≤ 3.25E-12	≥231
	H4H10447P2	126	36	4.69E+06	5.00E-05	≤ 1.07E-11	≥231
	H4H10448P2	175	49	7.86E+06	5.00E-05	≤ 6.36E-12	≥231
	H4H10452P2	146	43	7.94E+06	5.00E-05	≤ 6.30E-12	≥231
	H4H10468P2	98.7 ± 0.7	24.5	1.22E+07	5.00E-05	≤ 4.10E-12	≥231
	H2aM10965N	435	80	2.35E+06	4.15E-03	1.77E-09	3
	对照 1	93.9 ± 0.7	18.0	8.99E+06	5.00E-05	≤ 5.56E-12	≥231

[0193] 对于斜体的 k_d 值,在这些实验条件下未观察到分析物的解离,并且因此 k_d 值固定在 $5.0E-05s^{-1}$ 。

[0194] 表5:在25°C下抗激活素A抗体与激活素B的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)	
	H4H10423P	83.1 ± 0.6	4.7	4.89E+05	3.02E-02	6.18E-08	0.4
	H4H10429P	112.3 ± 0.7	26.4	3.49E+06	1.31E-02	3.75E-09	0.9
	H4H10432P2	104.4 ± 1.8	5.1	NB	NB	NB	NB
[0195]	H4H10436P2	110.8 ± 3.9	32.8	9.52E+06	5.28E-04	5.54E-11	21.9
	H4H10440P2	75.7 ± 0.8	18.8	1.06E+06	1.16E-03	1.09E-09	10.0
	H4H10442P2	136 ± 0.7	3.4	NB	NB	NB	NB
	H4H10430P	88 ± 0.5	3.9	NB	NB	NB	NB
	H4H10446P2	101.5 ± 0.4	3.6	NB	NB	NB	NB
	H4H10468P2	92.5 ± 0.2	6.2	NB	NB	NB	NB
	对照 1	84.1 ± 0.3	6.4	NB	NB	NB	NB

[0196] 表6:在37°C下抗激活素A抗体与激活素B的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
[0197]						

[0198]

H4H10423P	96 ± 1.2	4.4	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	142.8 ± 1.3	25.3	3.43E+06	3.43E-02	9.98E-09	0.3
H4H10432P2	134.1 ± 1.7	5.1	NB	NB	NB	NB
H4H10436P2	132 ± 1.4	38.1	9.78E+06	1.36E-03	1.39E-10	8.5
H4H10440P2	94 ± 4.5	20.9	1.28E+06	4.19E-03	3.29E-09	2.8
H4H10442P2	173.1 ± 1.4	4.4	NB	NB	NB	NB
H4H10430P	105.8 ± 1.3	3.6	NB	NB	NB	NB
H4H10446P2	131.4 ± 1.2	3.8	NB	NB	NB	NB
H4H10468P2	95.5 ± 1	3.4	NB	NB	NB	NB
对照 1	90.2 ± 0.9	2.7	NB	NB	NB	NB

[0199]

表7:在25℃下抗激活素A抗体与激活素AB的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
H4H10423P	81.3 ± 0.5	14.7	6.13E+05	2.03E-02	3.31E-08	0.6
H4H10429P	110.7 ± 0.5	40.0	4.53E+06	1.03E-04	2.28E-11	111.7
H4H10432P2	101.2 ± 1.6	38.3	4.00E+06	2.27E-03	5.68E-10	5.1
H4H10436P2	107.5 ± 0.3	28.2	7.66E+06	2.61E-04	3.41E-11	44.2
H4H10440P2	73.7 ± 0.4	15.5	2.97E+06	5.26E-04	1.77E-10	22.0
H4H10442P2	133.3 ± 0.6	34.6	5.53E+06	1.77E-03	3.20E-10	6.5
H4H10430P	86.9 ± 0.5	33.0	1.17E+07	2.17E-04	1.85E-11	53.3
H4H10446P2	99.8 ± 0.4	31.9	4.99E+06	4.06E-03	8.15E-10	2.8
H4H10468P2	92.1 ± 0.2	34.7	3.76E+06	2.09E-03	5.56E-10	5.5
对照 1	83.5 ± 0.6	31.1	3.44E+06	2.83E-04	8.22E-11	40.9

[0201]

表8:在37℃下抗激活素A抗体与激活素AB的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
H4H10423P	90.8 ± 1.2	21.7	8.80E+05	2.13E-02	2.42E-08	0.5
H4H10429P	137.7 ± 1.2	50.0	6.47E+06	4.88E-04	7.55E-11	23.6
H4H10432P2	127.7 ± 1.3	44.4	5.40E+06	5.92E-03	1.10E-09	2.0
H4H10436P2	126.8 ± 0.8	33.9	1.03E+07	4.58E-04	4.43E-11	25.2
H4H10440P2	88.9 ± 1.7	17.7	5.20E+06	1.63E-03	3.14E-10	7.1
H4H10442P2	166.5 ± 1.7	45.9	9.17E+06	4.25E-03	4.64E-10	2.7
H4H10430P	101.6 ± 1.2	41.0	1.01E+07	5.41E-04	5.35E-11	21.3
H4H10446P2	126.6 ± 1.2	41.5	6.08E+06	8.17E-03	1.34E-09	1.4
H4H10468P2	92.2 ± 0.8	34.5	5.03E+06	4.43E-03	8.80E-10	2.6
对照 1	86.4 ± 0.6	29.3	3.77E+06	7.38E-04	1.96E-10	15.7

[0203]

表9:在25℃下抗激活素A抗体与激活素AC的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
H4H10423P	79.9 ± 0.4	-0.8	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	108.9 ± 0.5	28.0	9.13E+05	9.10E-05	9.97E-11	126.9
H4H10432P2	101.6 ± 0.7	34.9	6.29E+05	1.87E-03	2.98E-09	6.2
H4H10436P2	106.7 ± 0.4	30.1	6.98E+05	1.56E-03	2.24E-09	7.4
H4H10440P2	73.5 ± 0.4	11.8	5.13E+05	2.27E-04	4.42E-10	50.8
H4H10442P2	132.5 ± 3.1	18.6	1.31E+06	2.05E-03	1.57E-09	5.6
H4H10430P	85.1 ± 0.3	23.6	1.23E+06	1.09E-02	8.86E-09	1.1
H4H10446P2	96.9 ± 0.5	12.6	1.04E+06	1.22E-02	1.18E-08	0.9
H4H10468P2	91.4 ± 0.3	17.2	7.98E+05	5.92E-03	7.41E-09	2.0
对照 1	82.5 ± 0.3	22.3	5.58E+05	2.25E-03	4.03E-09	5.1

[0205] 表10: 在37°C下抗激活素A抗体与激活素AC的结合特性

抗体	捕获的 mAb 的量 (RU ± SE)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D (摩尔)	$t_{1/2}$ (分钟)
H4H10423P	85.9 ± 1.1	0.0	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	132.6 ± 1.2	35.7	1.34E+06	6.20E-04	4.62E-10	18.6
H4H10432P2	123.8 ± 1.4	34.6	7.22E+05	9.02E-03	1.25E-08	1.3
H4H10436P2	122.9 ± 1.3	32.6	8.81E+05	3.31E-03	3.75E-09	3.5
H4H10440P2	86.6 ± 2.7	13.3	7.18E+05	7.55E-04	1.05E-09	15.3
H4H10442P2	160.1 ± 1.5	21.4	1.46E+06	5.99E-03	4.10E-09	1.9
H4H10430P	96.8 ± 1	25.3	1.20E+06	2.00E-02	1.67E-08	0.6
H4H10446P2	120.3 ± 1	14.4	9.59E+05	2.16E-02	2.25E-08	0.5
H4H10468P2	88.4 ± 0.8	10.7	7.19E+05	1.24E-02	1.73E-08	0.9
对照 1	83.2 ± 0.9	15.6	6.51E+05	6.52E-03	1.00E-08	1.8

[0207] 如表3和表4所示,本发明的抗激活素A抗体与激活素A结合,在25°C下 K_D 值在小于3.18pM(即, $\leq 3.18E-12$)至745pM(即, $7.45E-10$)的范围内,并且在37°C下 K_D 值在小于2.18pM(即, $\leq 2.18E-12$)至1.77nM($1.77E-09$)范围内。如表5和表6所示,在25°C或37°C下,几种抗激活素A抗体(即,H4H10432P2、H4H10442P2、H4H10430P2、H4H10446P2和H4H10468P2)显示没有可测量的与激活素B的结合。一些抗体表现出可测量的与激活素AB的结合,其中 K_D 值在25°C下为约18.5pM(即, $1.85E-11$)至33.1nM(即, $3.31E-08$) (表7),并且在37°C下为约44.3pM(即, $4.43E-11$)至24.2nM(即, $2.42E-08$) (表8)。一些抗体表现出可测量的与激活素AC的结合,其中 K_D 值在25°C下为约99.7pM(即, $9.97E-11$)至11.8nM(即, $1.18E-08$) (表9),并且在37°C下为约462pM(即, $4.62E-10$)至22.5nM(即, $2.25E-08$) (表10)。此外,本发明测试的抗激活素A抗体中没有显示出一个显示可测量的与抑制素E的结合(数据未显示)。

[0208] 实施例4. 用抗激活素A抗体抑制激活素A介导的受体激活和SMAD复合物信号传导

[0209] 为了进一步表征本文讨论的抗激活素A抗体,开发了生物测定法以检测激活素IIA型和IIB型受体(分别为ActRIIA和ActRIIB)的激活以及随后激活素I型受体的磷酸化和激活。ActRIIA和ActRIIB与激活素之间的相互作用导致诱导不同的细胞过程,包括生长调节、癌细胞转移和胚胎干细胞分化(Tsuchida, K. 等人, Cell Commun Signal 7:15(2009))。I型受体的磷酸化和激活导致SMAD 2和SMAD 3蛋白的磷酸化,它们形成激活的SMAD复合物,导致基因的转录调节。

[0210] 为了检测通过激活素与激活素II型受体的结合导致的SMAD复合物信号转导途径的激活,将人A204横纹肌肉瘤细胞系(ATCC,#HTB-82)用Smad 2/3-荧光素酶报告质粒(CAGAx12-Luc;Dennler,1998)转染以产生A204/CAGAx12-Luc细胞系。将A204/CAGAx12-Luc细胞保持在补充有10%胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素/谷氨酰胺和250 μ g/mL G418的McCoy's 5A(Irvine Scientific,#9090)中。为了进行生物测定,在低血清培养基,0.5% FBS和OPTIMEM(Invitrogen,#31985-070)中,将A204/CAGAx12-Luc细胞以10,000个细胞/孔接种到96孔测定板上,并在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂条件下培养过夜。为了测定配体剂量响应,将激活素A(R&D Systems,#338-AC)、激活素B(R&D Systems,#659-AB)、激活素AB(R&D Systems,#1066-AB)和激活素AC(R&D Systems,#4879-AC/CF)以1:3从100nM连续稀释至0.002nM,并且与不含激活素的对照一起加入到细胞中。观察到激活素A、激活素B、激活素AB和激活素AC激活A204/CAGAx12-Luc细胞系,EC₅₀值分别为99pM、47pM、19pM和4.4nM。为了测量抑制,将抗体以1:3从100nM至0.002nM、1000nM至0.02nM或300nM至0.005nM(包括含有适当同种型对照抗体或无抗体的对照样品)开始连续稀释,并以100pM激活素A、50pM激活素B、30pM激活素AB或4nM激活素AC的恒定浓度加入到细胞中。在此测定中也用作阳性阻断对照的是对照4(ActRIIB-hFc;SEQ ID No:227)。在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂条件下温育5.5小时后,加入OneGlo底物(Promega,#E6051),然后使用Victor X(Perkin Elmer)仪器检测荧光素酶活性。使用Prism 5软件(GraphPad),利用非线性回归(4-参数逻辑)分析结果。

[0211] 如表11所示,本发明的抗激活素A抗体以39pM至3.5nM范围内的IC₅₀值阻断100pM激活素A,而对照1以83pM的IC₅₀值被阻断。测试了本发明的抗激活素A抗体的子集对激活素B、激活素AB和激活素AC的阻断。所测试的9种抗体中的四种阻断50pM激活素B,其IC₅₀值范围为130pM至100nM。测试激活素B阻断的本发明的五种抗体仅在高抗体浓度下被阻断,而对照1未显示任何可测量的激活素B阻断。本发明测试的八种抗体以100pM至8.2nM范围内的IC₅₀值阻断30pM激活素AB,而对照4以540pM的IC₅₀值被阻断。一种抗体,H4H10423P,仅表现出对激活素AB的弱阻断。所测试的8种抗体中的七种以580pM至6.5nM范围内的IC₅₀值阻断4nM激活素AC,而对照4以1.1nM的IC₅₀值被阻断。一种抗体,H4H10423P,未表现出对激活素AC的任何阻断。小鼠IgG(mIgG同种型对照)和人IgG(hIgG同种型对照)的阴性对照均不阻断受体的配体激活。

[0212] 表11:激活素A、激活素B、激活素AB和激活素AC由抗激活素A抗体进行的抑制(IC₅₀ [M])

[0213]

常数:	激活素 A	激活素 B	激活素 AB	激活素 AC
抗体				
H4H10423P	2.0E-10		弱阻断剂	非阻断剂
H4H10424P	7.6E-10			
H4H10426P	2.3E-10			
H4H10429P	1.6E-10	7.9E-08	2.9E-10	5.8E-10
H4H10430P	6.1E-11	在高浓度下阻断	1.0E-10	9.3E-10
H4H10432P2	1.1E-10	在高浓度下阻断	8.0E-10	2.8E-09
H4H10433P2	1.5E-10	1.0E-07		
H4H10436P2	2.0E-10	1.3E-10	1.4E-10	1.3E-09

[0214]	H4H10437P2	2.9E-10	在高浓度下阻断		
	H4H10438P2	2.6E-10			
	H4H10440P2	2.8E-10	5.2E-09	4.3E-10	7.5E-10
	H4H10442P2	5.6E-11		2.2E-09	6.5E-09
	H4H10445P2	5.3E-11			
	H4H10446P2	4.7E-11	在高浓度下阻断	8.2E-09	5.6E-09
	H4H10447P2	7.8E-11			
	H4H10448P2	4.6E-11			
	H4H10452P2	5.8E-11			
	H4H10468P2	3.9E-11	在高浓度下阻断	2.3E-09	3.4E-09
	H2aM10965N	3.5E-09			
	mIgG 同种型对照	非阻断剂			
	hIgG 同种型对照	非阻断剂	非阻断剂	非阻断剂	非阻断剂
	对照 1	8.3E-11	非阻断剂	5.4E-10	1.1E-09

[0215] 使用A204/CAGAx12-Luc细胞的生物测定也可受到GDF8 (R&D Systems, Cat#788-G8/CF) 和GDF11 (R&D Systems, Cat#1958-GD-010/CF) 的刺激。为了测试激活素A抗体对这些配体的功能抑制,使用上述条件进行测定,但用GDF8或GDF11替代激活配体,这导致EC₅₀值分别为188pM和84pM。在该测定中,由恒定浓度的0.50nM GDF8或0.40nM GDF11的激活被对照4完全阻断,其IC₅₀值分别为298pM和214pM。使用这些相同的恒定浓度的配体,当在高达100nM的抗体下测试时,没有观察到激活素A抗体H4H10446P2和H4H10430P对GDF8或GDF11的抑制。在另一天,在恒定浓度的250pM GDF8或250pM GDF11的存在下,在该测定中测试激活素A抗体H4H10429P和H4H10436P2的抑制,并且在用高达150nM的测试的激活素A抗体培养细胞后未观察到抑制;在该测定中单独的GDF8和GDF11分别表现出124pM和166pM的EC₅₀值。这些数据证明激活素A抗体H4H10446P2、H4H10430P、H4H10429P和H4H10436P2在功能上不抑制GDF8或GDF11。

[0216] 实施例5. 使用激活素A抗体阻断激活素A结合

[0217] 使用Biacore 3000仪测定所选抗激活素A抗体阻断激活素A与其受体ActRIIB和ActRIIA、及其内源拮抗剂卵泡抑素的相互作用的能力。为了进行该实验,对照4(表达有C-末端人Fc标签(SEQ ID:227)的人ActRIIB)、表达有C-末端人Fc标签的人ActRIIA(hActRIIA-Fc;R&D Systems,#340-R2-100)或卵泡抑素-288(R&D Systems,#5836-FS-025)胺偶联至Biacore CM5传感器表面上。激活素A(R&D Systems,#338-AC)以5nM的固定浓度单独或与激活素A抗体、hActRIIA-Fc、hActRIIB-Fc或同种型对照抗体以60nM的最终浓度(相对于激活素A12倍摩尔过量)混合,在室温下培养1小时。然后将抗体-激活素A混合物以20uL/分钟的流速注射到胺偶联的对照4、hActRIIA-Fc或卵泡抑素-288表面上。在注射开始后150秒测量结合信号(RU),并将该信号减去阴性对照参考表面的测量RU值以测定特异性结合信号。在每种抗激活素A抗体的存在下,将游离激活素A与受体或拮抗剂表面结合的百分比计算为观察到的特异性结合信号除以无抗体存在情况下5nM激活素A的特异性结合信号的比率。

[0218] 表12:通过抗激活素A抗体阻断激活素A与卵泡抑素的结合

[0219]

卵泡抑素-288 表面 (捕获的 3000RU) -相对于激活素 A 标准化 (%结合 RU w/ 无抑制剂)												
mAb/蛋白浓度(mM)	H4H10442P2	H4H10446P2	H4H10430P	H4H10440P2	H4H10429P	H4H10436P2	H4H10423P	对照 1	对照 3	hActRIIA-hFc	对照 4(hActRIIB-hFc)	同种型(-)对照
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.94	73	77	79	76	97	78	120	83	172	156	169	100
1.88	46	54	59	57	80	61	122	68	170	148	163	102
3.75	6	7	15	17	20	16	103	27	145	138	151	97
7.5	3	3	1	4	1	1	97	0	33	116	120	102
15	3	3	1	2	1	1	96	1	5	60	43	102
30	3	3	1	1	2	2	94	1	7	11	1	104
60	3	3	1	0	3	2	93	2	9	13	1	103

[0220] 如表12所示,所测试的7种抗激活素A抗体中的6种以及对照1和对照3都阻断了肌动蛋白A与卵泡抑素-288的结合。一种抗体,H4H10423P,不阻止激活素A与卵泡抑素-288的结合。对照4和hActRIIA-Fc在较高浓度下阻断激活素A与卵泡抑素-288的结合。

[0221] 表13:通过抗激活素A抗体阻断激活素A与hActRIIA-Fc的结合

[0222]

hActRIIA-hFc 表面 (捕获的 8000RU) -相对于激活素 A 标准化 (%结合 RU w/ 无抑制剂)												
mAb/蛋白浓度(mM)	H4H10442P2	H4H10446P2	H4H10430P	H4H10440P2	H4H10429P	H4H10436P2	H4H10423P	对照 1	对照 3	hActRIIA-hFc	对照 4(hActRIIB-hFc)	同种型(-)对照
0.00	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.94	114	111	81	75	87	75	112	82	207	236	276	109
1.88	114	115	62	52	66	55	114	66	190	222	266	112
3.75	95	85	19	17	19	16	111	28	139	188	231	110
7.50	105	94	3	6	1	2	110	1	32	128	160	115
15	113	108	2	4	1	2	112	1	1	50	51	116
30	117	98	2	3	1	2	114	1	1	5	2	118
60	118	118	2	3	1	2	116	2	0	3	1	119

[0223] 如表13所示,所测试的7种抗激活素A抗体中的4种以及对照1和对照3均阻断hActRIIA-Fc与激活素A的结合。三种抗体,H4H10442P2、H4H10446P2和H4H10423P,不阻止激活素A与hActRIIA-Fc的结合。对照4和hActRIIA-Fc阻断激活素A与hActRIIA-Fc的结合。

[0224] 表14:通过抗激活素A抗体阻断激活素A与hActRIIB-Fc的结合

hActRIIB-hFc (对照 4) 表面 (捕获的 4000RU) -相对于激活素 A 标准化 (%结合 RU w/无抑制剂)													
[0225]	mAb/蛋白浓度(nM)	H4H10442P2	H4H10446P2	H4H10430P	H4H10440P2	H4H10429P	H4H10436P2	H4H10423P	对照 1	对照 3	hActRIIA-hFc	对照 4(hActRIIB-hFc)	同种型(-)对照
	0.00	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.94	110	107	80	79	87	80	93	85	135	131	149	105
	1.88	106	105	62	58	67	60	78	69	133	129	148	105
	3.75	88	76	20	19	19	19	47	31	120	127	144	104
	7.50	103	95	4	7	2	3	42	2	33	113	130	107
	15	115	115	3	4	2	2	42	2	2	56	51	110
[0226]	30	122	89	3	4	2	3	41	2	1	5	3	111
	60	124	129	3	4	3	4	41	3	2	5	2	115

[0227] 如表14所示,所测试的7种抗激活素A抗体中的4种以及对照1和对照3都阻断了激活素A与hActRIIB-Fc的结合。两种抗体,H4H10442P2和H4H10446P2,不阻止激活素A与hActRIIB-Fc的结合。一种抗体,H4H10423P,在所测试的更高浓度的抗体下证明能够部分阻断激活素A与hActRIIB-Fc的结合。hActRIIB-Fc和hActRIIA-Fc阻断激活素A与hActRIIB-Fc的结合。

[0228] 实施例6.激活素A诱导上游信号转导并激活人诱导的多能干细胞心肌细胞中的心脏应激基因

[0229] 为了培养人诱导多能干细胞衍生(IPSC)的心肌细胞,将组织培养容器用10 μ g/mL纤连蛋白(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)在37 $^{\circ}$ C下预包被1小时。根据制造商的说明书,将人iPSC-CM(iCell Cardiomyocytes²;Fujifilm Cellular Dynamics, Madison,WI,USA)储存、解冻并铺板。简而言之,将细胞快速解冻(37 $^{\circ}$ C,3分钟)并在平板培养基中缓慢稀释。为了进行基因表达分析和磷酸化测定,将5 \times 10⁵个细胞接种到12孔板的每个孔中。为了进行阻抗、电生理学和钙通量测定,将细胞以5 \times 10⁴个细胞/孔的密度铺在96孔板中。将细胞维持在具有5% CO₂的湿润37 $^{\circ}$ C培养箱中,每48小时更换培养基。在开始每次实验之前,将细胞维持在培养物中直到形成同步、搏动的单层细胞(~10-14天)。

[0230] 为了检测SMAD磷酸化,将细胞暴露于1nM激活素A(R&D Systems,Minneapolis,MD,USA)30分钟。将细胞用冷的磷酸盐缓冲盐水洗涤两次,并用补充有HaltTM蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Fisher Scientific)的RIPA裂解和提取缓冲液(Thermo Fisher Scientific)裂解。将裂解物离心(14,000 \times g,15分钟)并使用Pierce BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific)来定量总蛋白。根据制造商的说明书,使用用于毛细管电泳WesTMSystem(ProteinSimple,San Jose,CA,USA)的12-230kDa分离模块,在还原条件下进行细胞裂解物中的蛋白检测。用5 \times 还原缓冲液将蛋白样品稀释至0.5mg/mL的最终浓度、变性(5分钟,95 $^{\circ}$ C)、并置于冰上。组装盒板,将其旋转(1000 \times g,5分钟)并置于WesTM仪器中。从Cell Signaling Technologies(Danvers,MA,USA)获得一抗。Phospho-SMAD2(Ser465/

467)/SMAD3(Ser423/425)以1:50稀释,SMAD2/3以1:50稀释,并且GAPDH以1:100稀释。抗兔检测模块(ProteinSimple)提供有抗体稀释剂、1×抗兔二抗、链霉亲和素-HRP缀合物和化学发光检测试剂。使用Compass软件(ProteinSimple)分析蛋白检测,其量化来自感兴趣的蛋白的峰化学发光信号的曲线下面积和高度。在暴露于1nM激活素A($P<0.001$)30分钟的iPSC-CM中,SMAD2/3磷酸化显著增加83%。抑制性激活素A抗体(mAb2;H\$H10446P2)阻断SMAD磷酸化的这种增加(参见图12)。这些数据证明激活素A诱导iPSC-CM中的信号转导。

[0231] 为了分析基因表达,PCR反应(总共20 μ L)含有10 μ L 2×TaqMan Gene Expression Master Mix(Thermo Fisher Scientific)、1 μ L 20×TaqMan探针、5 μ L(10ng)cDNA和4 μ L水,并在QuantStudio™3Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific)上运行。热循环仪设置如下:95℃15分钟,然后40个以下循环:95℃15秒,后接60℃60秒。通过QuantStudio™3仪器软件产生扩增曲线,并导出所得循环阈值(Ct)。GAPDH用作内源对照。对于所有RT-qPCR分析,使用delta-delta Ct($2^{-\Delta\Delta Ct}$)方法(Pfaffl 2001)来计算基因表达的相对倍数变化。IPSC心肌细胞暴露于激活素A(急性-24小时,或慢性-6次处理)激活下游激活素A信号转导基因FSTL3(aka FLRG)和Serpine1(aka PAI-1)以及心房利钠肽(NPPA)和B型利钠肽(NPPB)的表达,它们是心脏应激的常见标志物(参见图10)。

[0232] 实施例7.抗激活素A诱导被抗激活素A抗体阻断的IPSC心肌细胞的收缩和电生理功能障碍

[0233] 使用CardioExcyte 96(Nanon Technologies,Munich,Germany)表征iPSC-CM的收缩性(阻抗)和电生理学,该系统是能够在生理培养条件下在无标记环境中同时记录心肌细胞的搏动单层的阻抗(收缩性)和细胞外场电位(EFP)的混合系统。在该研究中,将iPSC-CM铺板在含有电极的96孔板(NSP-96;Nanon Technologies)上,并且每4小时记录30秒。使用Data Control 96软件(Nanon Technologies)分析阻抗和EFP数据。

[0234] 将IPSC心肌细胞铺板并与培养基或不同浓度的激活素A(R&D Systems)接触一次或连续接触,同时在整个实验中测量收缩振幅(阻抗)。如图1B所示,IPSC心肌细胞慢性暴露于激活素A(6次处理)导致振幅以剂量依赖性方式呈下降趋势。观察到单次暴露的最小影响(参见图1A)。

[0235] 如上所述,使用铺板的人IPSC心肌细胞,应用抗激活素A抗体(mAb1;H4H10430P)来预防功能受损。如图2所示,相对于同种型对照,应用mAb1预防所有测试剂量的收缩振幅下降。

[0236] 对于EFP记录,测量细胞外的瞬时电活动,随后反转平均搏动以模拟心肌细胞的动作电位。对于每个平均搏动,表征振幅、下行速度(去极化期间的最大斜率)和场电位持续时间(FPDMax:在去极化的第一次偏转和复极化曲线的最大值之间的时间)。与对照相比,在用激活素A(1nM)慢性处理的心肌细胞中观察到延长的动作电位(0.56 ± 0.01 对 0.49 ± 0.02 秒, $P<0.01$)。25nM的抑制性抗体(mAb1)防止了这种动作电位持续时间的增加,而同种型对照抗体则没有(0.51 ± 0.05 对 0.56 ± 0.02 秒)。与培养基对照相比,慢性暴露于激活素A引起场电位振幅的降低(48.58 ± 6.52 对 $74.52\pm 11.66\mu\text{V}$, $P<0.01$)。与25nM同种型对照抗体相比,25nM抑制性抗体(mAb1)阻止了这种降低(85.55 ± 19.82 对 $42.87\pm 2.00\mu\text{V}$)。与培养基对照相比,暴露于激活素A还降低了场电位下行速度(0.018 ± 0.006 对 $0.034\pm 0.005\text{V/秒}$, $P<0.001$)。激活素A加25nM抑制性抗体(mAb1)防止这种下行速度的降低,而25nM同种型对照抗

体则未防止这种下行速度的降低 (0.039 ± 0.009 对 0.019 ± 0.002 V/秒) (参见图13A和图13B)。

[0237] 使用EarlyTox Cardiotoxicity试剂盒 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) 评估钙通量。根据制造商的说明书进行钙染料加载。将EarlyTox钙染料重悬浮在所提供的缓冲液中, 并与心肌细胞维持培养基一起以1:1的比例加入到细胞中。将板培养2小时 (37°C , 5% CO_2), 然后在FLIPR Tetra System (Molecular Devices) 上, 在 37°C 下记录钙通量2分钟, 使用以下参数: 激发, 470-495nm; 发射, 515-575nm; 暴露时间, 50ms; LED强度, 50%; 间隔时间0.1秒。使用SoftMax Pro Software (Molecular Devices) 产生并分析钙通量迹线。与培养基对照相比, 激活素A (1nM) 的慢性处理降低了峰值钙通量振幅 (447 ± 33 对 609 ± 99 RFU, $p < 0.05$)、增加了钙通量下降时间 (0.70 ± 0.04 秒对 0.52 ± 0.05 秒, $p < 0.0001$) 并增加了钙通量上升时间 (0.40 ± 0.06 对 0.24 ± 0.03 秒, $p < 0.01$)。与用激活素A加同种型对照抗体处理的细胞中的 484 ± 37 RFU 相比, 用激活素A加抑制性抗体 (mAb1) 处理的细胞中的峰值钙调控振幅为 759 ± 129 RFU。当与同种型对照抗体比较时, 激活素A抑制抗体 (mAb1) 防止钙通量下降时间 (0.58 ± 0.04 对 0.75 ± 0.08 秒) 和上升时间 (0.27 ± 0.1 对 0.36 ± 0.05 秒) 的增加, 而同种型对照抗体则不防止 (参见图14A和图14B)。

[0238] 这些数据表明, 激活素A含量的升高可直接作用于心肌细胞, 并且可能导致老年人群的心力衰竭和心功能不全。

[0239] 实施例8. 激活素A、卵泡抑素相关基因 (FLRG) 和纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) 的血清含量在COVID-19患者中升高, 并且与疾病严重程度相关

[0240] 从COVID-19患者中收集血清样品, 并根据标准方案 (R&D Systems) 进行ELISA以测量激活素A、FLRG和PAI-1的浓度。激活素A ELISA样品以1:1稀释, 并且FLRG ELISA样品以1:5稀释。将患者样品在冰上解冻, 并且在解冻时将每个样品等分用于三次ELISA以防止冻融效应。商业对照血清用于产生带有男性和女性血清的平板对照, 其用于标准化数据。在BioTek Synergy Neo2多模式读取器上读取ELISA。对于FLRG数据, 如果任何样品高于标准曲线, 则结果以标准曲线的最大量 (4000pg/mL) 输入。

[0241] 将根据病情严重程度和氧合需求分组的描述统计值报告为用于连续变量的中值 (四分位距); IQR) 和用于分类变量的频率 (百分比; %)。Kruskal Wallis检验用于跨三个或更多个组的连续变量, 并且Wilcoxon符号秩检验用于两个组之间的连续变量。Fisher精确检验用于分类变量。使用Kruskal Wallis检验和随后的Dunn成对比较 (用于显著多项检验结果) 来检验激活素A、FLRG和PAI-1在基线处的疾病严重程度和氧需求的差异。对于纵向结果, 包括死亡率和临床评分改善 (≥ 1 点), 使用对数回归模型, 以基线激活素A、FLRG和PAI-1 (标准化) 作为预测因子, 包括和不包括协变量。还针对这些纵向结果变量生成了具有可获得的事件发生时间信息的Fine-Gray部分分布风险模型。基于每个分析物单独的基线值的中值分离, 将受试者分成病毒载量分组 (低、高)。在包括和不包括协变量的情况下计算高组相对于低组的部分分布风险比 (sHR)。分别在第60天和第29天检查全死因死亡率和临床评分改善事件发生时间数据。在检查的时间点计算研究期间每个结果的发生率。

[0242] 结果显示在图3-9中, 其证实了相对于对照, COVID-19患者中激活素A、FLRG和PAI-1的血清含量的显著增加, 以及激活素A、FLRG和PAI-1的血清含量与疾病严重程度之间的相关性。FLRG和PAI-1都是激活素A途径激活的生物标志物。

[0243] 激活素A和FLRG含量与病情最严重的COVID-19患者相关,因为它们ICU患者中提升程度最高(图4)。检查了COVID-19患者中在研究登记时的氧需求与具有基线激活素A、FLRG和PAI-1的全死因死亡率之间的关系。存活患者的基线激活素A(中值=336.8pg/mL)显著低于死亡患者的基线激活素A(中值=547.5pg/mL; $p<0.0001$)。对于FLRG观察到相同的趋势,其存活患者的基线激活素A(中值=12141.8pg/mL)显著低于死亡患者的基线激活素A(中值=17633.6pg/mL; $p<0.0001$)。基线PAI-1水平在死亡率方面没有显著差异($p=.52$)。

[0244] 根据氧装置类型,将基线处的供氧状态分为三类:低流量、高流量和有创机械通气(Invasive Mechanical Ventilation, IMV)。对于激活素A($H(2)=48.2$; $p<0.0001$)、FLRG($H(2)=37.1$; $p<0.0001$)和PAI-1($H(2)=11.3$; $p=0.0004$),观察到这三组之间的差异。低流量患者的激活素A最低(中值=236.5pg/mL),高流量患者的激活素A较高(403.7pg/mL),而IMV患者的激活素A最高(中值=499.6pg/mL)。然而,高流量患者和IMV患者之间的激活素A没有显著差异($z=1.8$, $p>0.0167$)。对于FLRG观察到相同的趋势,低流量患者的FLRG最低(中值=9399.0pg/mL),高流量患者的FLRG较高(中值=14117.1pg/mL),而IMV患者的FLRG最高(中值=15424.3pg/mL)。所有成对比较都是显著的($p<0.0167$)。与高流量患者(中值=17.5ng/mL)和IMV患者(中值=19.2ng/mL)相比,低流量患者(中值=16.7ng/mL)的PAI-1也较低。然而,除了高流量和IMV($z=1.6$, $p>0.0167$)之外,在低流量和高流量患者之间的PAI-1没有显著差异($z=2.1$, $p>0.0167$)。这些数据表明,激活素A及其途径标志物(FLRG)与对较高氧水平的需要相关,但是在所有COVID-19组中仍然高的PAI-1水平不预示对更高氧的需要。下表15显示了根据基线补充氧需求分组的患者的实验室结果、研究进展和临床结果的汇总。

[0245] 表15. 根据基线补充氧需求分组的激活素通路实验室结果、研究进展和临床结果。

	低流量 (n = 62)	高流量 (n = 134)	有创机械通气 (n = 116)	<i>p</i>
激活素途径				
激活素 A(pg/mL)	236.5 (182.2-346.1)	403.7 (271.7-607.5)	499.6 (324.9-726.9)	
FLRG(pg/mL)	9399 (7233-12497)	14117 (9889-18800)	15424 (11239-22936)	
PAI-1(ng/mL)	16.7 (12.7-18.6)	17.5 (13.7-22.5)	19.2 (15.5-25.6)	
研究进展 (天)				
发烧	1 (1.3)	2 (1-4)	4 (1-7)	
相应速率> 24bpm	2 (1-6)	4 (1-11)	6 (3-13)	
低氧血症	8 (5-10)	12 (8-24)	17 (10-28)	
补充氧气使用	7 (4-10)	12 (8-23)	17 (10-28)	
临床结果				
全死因死亡率	8 (12.9)	33 (24.6)	45 (38.8)	
临床改善(1pt)	51 (82.2)	88 (65.7)	58 (50.0)	
供氧改善	44 (71.0)	92 (68.7)	65 (56.0)	
出院	50 (80.6)	83 (61.9)	46 (39.7)	

[0247] 注:汇总统计表示为连续变量的中值(IQR)和分类变量的计数(%)。

[0248] 如表15所示,对于COVID-19患者,激活素A和FLRG(而不是其他途径标志物如PAI-1)预示COVID-19的最差结果,包括对更有创供氧的需求、住院医疗所需的时间和死亡的可

能性。

[0249] 考虑到在COVID-19患者中激活素A及其途径标志物FLRG与供氧需求和死亡风险的特有相关性,研究了炎症细胞因子诱导激活素A的机理。

[0250] Cook Myosite人骨骼肌来源细胞(SKMDc)分化5天,并用100ng/ml IL1b或TNF α 和激活素A共处理,随后进行以下额外处理中的每一种:DMSO(作为阴性对照,仅含有载体)、IKKi(I Kappa激酶的抑制剂,其在细胞因子刺激的下游;3uM醉茄素A)、p38i(p38的抑制剂;0.3uM SB203580)、JNKi(Jnk的抑制剂;30uM SP600125)、IKKi+JNKi的组合、或p38i+JNKi的组合,持续24小时。通过ELISA定量条件培养基中的激活素A浓度。在每种主要处理条件(IL1b、TNF α)内,使用成对t检验将每种共处理的激活素A诱导与DMSO共处理进行比较。结果在图11中示出。仅显示了显著($p < 0.05$)Bonferroni校正的比较。在一组内,每个点为技术重复。相对于DMSO处理,IL-1或TNF α 处理后激活素A的诱导在IKKi处理的细胞中显著更低($t(2) = 41.4, p = 0.0006$)。相比之下,相对于DMSO处理,用JNKi.和p38i+JNKi条件中的任一种处理的细胞表现出对激活素A诱导的低得多的抑制。使用IKKi的组合处理导致与单独使用IKKi的处理类似的抑制。因此,IL1和TNF通过IKK/NF-kappaB途径诱导激活素A,而不依赖于p38或Jnk,并且增加的细胞因子水平(例如,IL-1和TNF α)与COVID-19患者中增加的供氧需求和死亡风险相关。

[0251] 本发明不限于本文所描述的具体实施例的范围。事实上,除了本文所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述和附图中变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 利用激活素A拮抗剂预防和治疗心功能不全
和COVID-19的方法

<130> 10771W001

<150> 63/068,251

<151> 2020-08-20

<150> 63/111,394

<151> 2020-11-09

<150> 63/139,234

<151> 2021-01-19

<160> 228

<170> Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

```
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctgctgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgag ttgatcagg 120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat attacagggc caactggttt 180
aatgattatg cactttctgt gaaaagtcca ataaccatca acccagtcac atccacgaac 240
cacttctccc tgcagctgca ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagaagggg ctctgggata ctactttgac tctggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
           20           25           30
```

Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ala Asn Trp Phe Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Val Thr Ser Thr Asn
 65 70 75 80
 His Phe Ser Leu Gln Leu His Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ala Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

ggggacagtg tctctagcaa cagtgctgct

30

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

acatattaca gggccaactg gtttaat

27

<210> 6

<211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 10
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 11

caaagtgttt tatacagctc caacaataag aattat

36

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 12

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 13
 tgggcatct 9
 <210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 14
 Trp Ala Ser
 1
 <210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 15
 caccaatatt ttattactcc actcact 27
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 16
 His Gln Tyr Phe Ile Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 17

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatacaat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcccgg 300
 aattacgata ttttgactgg ttattataac ctcggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

<210> 18

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Asn Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Arg Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Leu Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 19

ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 20

<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 20	
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly	
1	5
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 21	
atatggtatg atggaagtaa taaa	24
<210> 22	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 22	
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys	
1	5
<210> 23	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 23	
gcgagagccc ggaattacga tattttgact ggttattata acctcggtat ggacgtc	57
<210> 24	
<211> 19	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	

<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 27	
cagggcatta gaaatgat	18
<210> 28	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 28	
Gln Gly Ile Arg Asn Asp	
1 5	
<210> 29	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 29	
gctgcatcc	9
<210> 30	
<211> 3	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 30	
Ala Ala Ser	
1	
<210> 31	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	

50		55		60													
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Ser	Leu	Phe		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85						90					95		
Val	Lys	Asp	Met	Val	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met		
				100						105					110		
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				115						120					125		

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 35

ggattcgcct ttgatgattt tgcc

24

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 36

Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe Ala

1 5

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 37

attagttgga atagtgatac catc

24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 38

Ile Ser Trp Asn Ser Asp Thr Ile

1

5

<210> 39

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 39

gtaaaagata tggttcgggg acttatagge tactactact acggtatgga cgtc 54

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 40

Val Lys Asp Met Val Arg Gly Leu Ile Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

1

5

10

15

Asp Val

<210> 41

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 41

gaaatagtgt tgacgcagtc tccagccatc ctgtctttgt ctccagggga aagagccatc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtatttac acctacttat cctggtacca acagacacct 120

ggccgggctc ccaggetcct catctatgag acatccagea gggccactgg catcccagcc 180

aggttcattg gcagtgggtc tgggacagac tteactetca ccatcagtag cctagagcct 240

gaagattttg cattttatta ctgtcagcac cgtagcgact ggctctccac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 42

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Tyr	Thr	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Glu	Thr	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ile	Gly
			50			55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asp	Trp	Pro	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100						105						

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 43

cagagtattt acacctac

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 44

Gln	Ser	Ile	Tyr	Thr	Tyr
1				5	

<210> 45

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成
 <400> 45
 gagacatcc 9
 <210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 46
 Glu Thr Ser
 1
 <210> 47
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 47
 cagcaccgta gcgactggcc tcccact 27
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 48
 Gln His Arg Ser Asp Trp Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 49
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 49
 cagggtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cgtctggatt caccgtcagt agttatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgtcagtt atatggtatg atggaagaaa taaagactat 180

gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240
 ttggaaatga aaggcctgag agccgaggac acggetcttt attattgtgc gagagacaaa 300
 actggggatt ttgactcctg gggccagga accctggtca cegtctctc a 351

<210> 50

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Met Lys Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Thr Gly Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 51

ggattcaccg tcagtagtta tggc

24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成
 <400> 52
 Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly
 1 5
 <210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 53
 atatggtatg atggaagaaa taaa 24
 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 54
 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5
 <210> 55
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 55
 gcgagagaca aaactgggga ttttgactcc 30
 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 56
 Ala Arg Asp Lys Thr Gly Asp Phe Asp Ser
 1 5 10
 <210> 57

<211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 57
 gacatccaga tgaccaggc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggtga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaacattaac agctttttaa gttggtatca gcagaaacca 120
 ggaaaagccc ctaagttcct gatctatgat gttccagta taaaagtgg ggccccatcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tteactetca ccatcagtag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttaacta ctgtcaacag agttacagtt ccccgttcac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Ile Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 59	
cagaacatta acagcttt	18
<210> 60	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 60	
Gln Asn Ile Asn Ser Phe	
1 5	
<210> 61	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 61	
gatgcttcc	9
<210> 62	
<211> 3	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 62	
Asp Ala Ser	
1	
<210> 63	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 63	
caacagagtt acagttcccc gttcact	27
<210> 64	
<211> 9	
<212> PRT	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 64

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 65

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 65

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtaaag cctctggatt cgcctttgat gatttcgcca tgcactgggt cggcaagct 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attgtttga acagtgggtga cataggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaactga atagtctgag aactgaggac acggccttgt atttctgtgt aaaagatatg 300
 gttcggggac ttatgggctt caactattac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 66

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Val Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Lys Asp Met Val Arg Gly Leu Met Gly Phe Asn Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 67

ggattcgcct ttgatgattt cgcc

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 68

Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 69

attgtttgga acagtggatga cata

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 70

Ile Val Trp Asn Ser Gly Asp Ile
 1 5

<210> 71

<211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 71
 gtaaaagata tggttcgggg acttatgggc ttcaactatt acggtatgga cgtc 54
 <210> 72
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 72
 Val Lys Asp Met Val Arg Gly Leu Met Gly Phe Asn Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val
 <210> 73
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 73
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca aactattagt acttatttag tctggtaccg acagagacct 120
 ggccaggctc ccagtctcct ctttatgat gcatccaaca gggccactga catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag ccttgagcct 240
 gaagatthttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcgccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321
 <210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 74
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Val Trp Tyr Arg Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 75

caaaactatta gtacttat

18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 76

Gln Thr Ile Ser Thr Tyr

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 77

gatgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 78
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 79
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 79
 cagcagcgta gcaactggcc gatcacc 27
 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 80
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 81
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 81
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggcaggte cctgacactc 60
 tcctgtgcag tctctggatt cacctttgat gatcatgcca tgcactgggt cggcaagct 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtgtgta tataggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcagatc tccagagaca acgccaagac ctccctctat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agttgacgac acggccttat attactgtgt gcaagattta 300
 aacgatattt tgactgggta tcccctcttt gacttttggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369
 <210> 82

<210> 85	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 85	
attagttgga atagtgtaag tata	24
<210> 86	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 86	
Ile Ser Trp Asn Ser Val Ser Ile	
1 5	
<210> 87	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 87	
gtgcaagatt taaacgatat ttgactggt tatccctct ttgacttt	48
<210> 88	
<211> 16	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 88	
Val Gln Asp Leu Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Leu Phe Asp Phe	
1 5 10 15	
<210> 89	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成
 <400> 89
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324
 <210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 90
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 91
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 91
 cagagcatta gcagctat 18
 <210> 92
 <211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 92

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 93

gctgcatcc

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 94

Ala Ala Ser

1

<210> 95

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 95

caacagagtt acagtacccc tccgateacc

30

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 96

<210> 99
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 99
 ggattcacct ttgatgatta tggc 24
 <210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 100
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
 1 5
 <210> 101
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 101
 attagttgga atagtggtaa cata 24
 <210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 102
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile
 1 5
 <210> 103
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成
 <400> 103
 gcaaaagatg ctgtgggggtt taactggaac tactttctct ttgactac 48
 <210> 104
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 104
 Ala Lys Asp Ala Val Gly Phe Asn Trp Asn Tyr Phe Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 105
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 105
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 acctgtgtag cgtctggatt caccgtcagt agttatggaa tgcactgggt ccgccaggcc 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atgttttatg atgaaagtaa aaaatattat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgaa 300
 cagctcgact ttgaatactg gggccaggga accctggcca cegtctctc a 351
 <210> 106
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 106
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Met Phe Tyr Asp Glu Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60													
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Glu	Gln	Leu	Asp	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105						110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											

115

<210> 107

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 107

ggattcaccg tcagtagtta tgga

24

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 108

Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 109

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 109

atgttttatg atgaaagtaa aaaa

24

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成		
<400> 110		
Met Phe Tyr Asp Glu Ser Lys Lys		
1	5	
<210> 111		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 111		
gcgagagatg aacagctcga ctttgaatac	30	
<210> 112		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 112		
Ala Arg Asp Glu Gln Leu Asp Phe Glu Tyr		
1	5	10
<210> 113		
<211> 369		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 113		
gaagtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60		
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcaactggg cggcaagct 120		
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180		
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240		
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggcettgt attactgtgc aaaagatata 300		
atgggggaact gggactactt ctacggtatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360		
gtctcctca	369	
<210> 114		
<211> 123		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 合成

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ile Met Gly Asn Trp Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 115

ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 117

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 117
 attagttgga atagtggtag cata 24
 <210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 118
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 119
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 119
 gcaaaagata taatggggaa ctgggactac ttctacggta tggacgtc 48
 <210> 120
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 120
 Ala Lys Asp Ile Met Gly Asn Trp Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 121
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 121
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60

Ala Lys Asp Ile Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 129
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 129
 gaagtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctacatt cacctttgat gattttgcca tgcactgggt cegtcaagct 120
 ccagggaaagg gtctggagtg ggtctctctt attactgggg atggtggtag cacatactat 180
 gcagaccctg tgaagggccg attcaccate tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac accgccttgt attactgtgt aaaagattgg 300
 tggatagcag ctctgcccga ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378
 <210> 130
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 130
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Phe Thr Phe Asp Asp Phe
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Leu Ile Thr Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Pro Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Asp Trp Trp Ile Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

- <210> 131
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 131
 acattcacct ttgatgattt tgcc 24
 <210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 132
 Thr Phe Thr Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5
 <210> 133
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 133
 attactgggg atggtggtag caca 24
 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 134
 Ile Thr Gly Asp Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 135
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成
 <400> 135
 gtaaaagatt ggtggatagc agctcgtccg gactactact actacggtat ggacgtc 57
 <210> 136
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 136
 Val Lys Asp Trp Trp Ile Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15
 Met Asp Val
 <210> 137
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 137
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccatc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctcttcagt agtcattct ggacctgat ccggcagccc 120
 ccaggaaagg gactggaatg gattggatat ctccattata gtgggggcac cagctacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt catcatatca gtggacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agctagatcg 300
 gggattactt ttgggggact tatcgtccct gttcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttca 378
 <210> 138
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 138
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
Gly Tyr Leu His Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
65	70	75
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90
Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Pro Gly Ser		
	100	105
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
	115	120
		125

<210> 139

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 139

ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 140

Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe

1 5

<210> 141

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 141

ctccattata gtgggggcac c

21

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 142

Leu His Tyr Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 143

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 143

gcgagagcta gatcggggat tacttttggg ggacttatcg tccctggttc ttttgatgc 60

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 144

Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Pro Gly

1 5 10 15

Ser Phe Asp Ile

20

<210> 145

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 145

gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc 60

ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttctc tcgcctggtc ccagcagaag 120

ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc 180

gaccggttca gtggaagcgg aagcggaaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag 240

ccagaggatt tcgccgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc 300

cagggcacga aggtagaaat caag 324

<210> 146

<211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 146
 Glu Ile 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 Val Ser 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 Thr 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 Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 147

cagtcagtct ctagctctta t

21

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 148

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 149
 ggggcaagt 9
 <210> 150
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 150
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 151
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 151
 caacagtacg gaagcagccc gtggacg 27
 <210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 152
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 153
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 153

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 atttgttctg tctctggtgg ctccttcagt agtcacttct ggagttgat ccggcagccc 120
 ccaggggaagg gactggagtg gattgggtat gtcctttaca gtgggggcac caattacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttcttcctg 240
 aaactgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgattatt actgtgcgag agctatatcg 300
 gggattacgt ttgggggaat tatcgtccct gttcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttca 378

<210> 154

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 154

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Ile	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Ser	His
			20					25					30		
Phe	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Tyr	Val	Leu	Tyr	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Ala	Ile	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Ile	Ile	Val	Pro	Gly	Ser
			100					105					110		
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 155

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 155

ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 156

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 156

Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe

1 5

<210> 157

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 157

gtcctttaca gtgggggcac c

21

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 158

Val Leu Tyr Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 159

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 159

gcgagagcta tategggat tacgtttggg ggaattatcg tcctgggtc ttttgatc 60

<210> 160

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 160

Ala Arg Ala Ile Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Ile Ile Val Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Phe Asp Ile
 20

<210> 161

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 161

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctcccttcagt agtcacttct ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggatat atcttataca ctgggggcac cagcttcaac 180
ccctccctca agagtcgagt ctccatgtca gtgggcacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aaattgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag agctagatcg 300
gggataacgt ttacgggtat tatcgtccct ggctcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca                                     378
```

<210> 162

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 162

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Leu Tyr Thr Gly Gly Thr Ser Phe Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Ser Met Ser Val Gly Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Thr Gly Ile Ile Val Pro Gly Ser

	100	105	110	
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser				
	115	120	125	
<210> 163				
<211> 24				
<212> DNA				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成				
<400> 163				
ggtggctcct tcagtagtca cttc				24
<210> 164				
<211> 8				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成				
<400> 164				
Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe				
1	5			
<210> 165				
<211> 21				
<212> DNA				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成				
<400> 165				
atcttataca ctgggggcac c				21
<210> 166				
<211> 7				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成				
<400> 166				
Ile Leu Tyr Thr Gly Gly Thr				
1	5			
<210> 167				
<211> 60				

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 167

gcgagagcta gatcggggat aacgtttacg ggtattatcg tccctggctc ttttgatc 60

<210> 168

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 168

Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Thr Gly Ile Ile Val Pro Gly

1 5 10 15

Ser Phe Asp Ile

20

<210> 169

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 169

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acttgttctg tctctgggtg ctccttcagt agtcacttct ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattggatat atccattaca gtgggggcac caattacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctt 240
 aaactgactt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgattatt actgtgagag agctatatcg 300
 gggattacgt ttgggggaat gatcgtccct ggttcttttg atgtctgggg cgaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttca 378

<210> 170

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 170

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Ile Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Met Ile Val Pro Gly Ser
 100 105 110
 Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 171

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 171

ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 172

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 172

Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe

1 5

<210> 173

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 173

atccattaca gtgggggcac c 21

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 174

Ile His Tyr Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 175

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 175

gcgagagcta tatcgggat tacgtttggg ggaatgatcg tcctgggttc ttttgatgtc 60

<210> 176

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 176

Ala Arg Ala Ile Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Met Ile Val Pro Gly

1 5 10 15

Ser Phe Asp Val

20

<210> 177

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 177

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcaactg tctctggtgg caccttcagt agtcaattct ggagctggat ccggcagccc 120

ccaggaaagg gactggagtg gattggatat atcttttaca ctgggggcac caaccacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agctagatcg 300
 gggattacgt ttgggggagt tatcgtccct gttcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttca 378

<210> 178

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 178

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Phe Tyr Thr Gly Gly Thr Asn His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Val Ile Val Pro Gly Ser
 100 105 110
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 179

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 179

ggtggcacct tcagtagtca ctcc

24

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

Ser Phe Asp Ile

20

<210> 185

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 185

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaaac cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctcttcagc agtcaattct ggaactggat cggcagtc 120
ccagggaggg gactggaatg gattggatat atctattaca gtgggggcac caactataac 180
ccctccttca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aaactgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtttt actgtgcgag agctagatcg 300
gggataacgt ttgggggagt tctcgtccct gtttcttttg atatttgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378
```

<210> 186

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 186

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
20           25           30
Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35           40           45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe Lys
50           55           60
Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys Ala
85           90           95
Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Val Leu Val Pro Gly Ser
100          105          110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115          120          125
```

- <210> 187
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 187
 ggtggctcct tcagcagtca ctte 24
 <210> 188
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 188
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5
 <210> 189
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 189
 atctattaca gtgggggcac c 21
 <210> 190
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 190
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr
 1 5
 <210> 191
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成

<400> 191

gcgagagcta gatcggggat aacgtttggg ggagttctcg tccctggttc ttttgatatt 60

<210> 192

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 192

Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Val Leu Val Pro Gly

1

5

10

15

Ser Phe Asp Ile

20

<210> 193

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 193

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtag ctccttcagt agtcaattct ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggggcac ccactacaac 180
 ccctccctcg agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtttatt actgtgagag agctagatcg 300
 gggattactt ttgggggact tatcgtccct gttcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttca 378

<210> 194

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 194

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His

20

25

30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 198

Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 199

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 199

gcgagagcta gatcggggat tacttttggg ggacttatcg tccctgggtc ttttgatc 60

<210> 200

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 200

Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Pro Gly

1 5 10 15

Ser Phe Asp Ile

20

<210> 201

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 201

egggtgcaac tgggtgcagtc tgggtctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaggg cttctggata catcttcacc agttatgata tcaattgggt gcgacaggcc 120
 actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta ataatggtaa cacagcctat 180
 acacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaaggga 300
 ttactatggt tcgggaagtt attaggttac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Asp

1 5

<210> 205

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 205

atgaacccta ataatggtaa caca

24

<210> 206

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 206

Met Asn Pro Asn Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 207

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 207

gcgagaaagg gattactatg gttcgggaag ttattagggt acggtatgga cgtc

54

<210> 208

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 208

Ala Arg Lys Gly Leu Leu Trp Phe Gly Lys Leu Leu Gly Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 209

<211> 324

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 209
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324
 <210> 210
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 210
 Glu Ile 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 Val Ser 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 Thr 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 Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 211
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 211

<220>

<223> 合成

<400> 216

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 217

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 217

Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr

20 25 30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ala Trp Lys Met Ser Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser

115 120

<210> 218

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 218

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala

1 5

<210> 219

<211> 8

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 222
 Gln Asp Ile Ser Asp Tyr
 1 5
 <210> 223
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 223
 Thr Thr Ser
 1
 <210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 224
 Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 225
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 225
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 20 25 30
 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
 35 40 45
 Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
 50 55 60
 Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser

65	70	75	80
Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly			
	85	90	95
Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser			
	100	105	
<210> 226			
<211> 426			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 226			
Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp Ile			
1	5	10	15
Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala			
	20	25	30
Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro			
	35	40	45
Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn			
	50	55	60
Met Leu His Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys			
65	70	75	80
Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu His Val Gly Lys Val Gly			
	85	90	95
Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu			
	100	105	110
Met Asn Glu Leu Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu			
	115	120	125
Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile Ser Lys Glu Gly			
	130	135	140
Ser Asp Leu Ser Val Val Glu Arg Ala Glu Val Trp Leu Phe Leu Lys			
145	150	155	160
Val Pro Lys Ala Asn Arg Thr Arg Thr Lys Val Thr Ile Arg Leu Phe			
	165	170	175
Gln Gln Gln Lys His Pro Gln Gly Ser Leu Asp Thr Gly Glu Glu Ala			
	180	185	190
Glu Glu Val Gly Leu Lys Gly Glu Arg Ser Glu Leu Leu Leu Ser Glu			
	195	200	205
Lys Val Val Asp Ala Arg Lys Ser Thr Trp His Val Phe Pro Val Ser			
	210	215	220
Ser Ser Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Lys Ser Ser Leu Asp Val			

225	230	235	240
Arg Ile Ala Cys Glu Gln Cys Gln Glu Ser Gly Ala Ser Leu Val Leu			
	245	250	255
Leu Gly Lys Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Gly Glu Gly Lys Lys Lys			
	260	265	270
Gly Gly Gly Glu Gly Gly Ala Gly Ala Asp Glu Glu Lys Glu Gln Ser			
	275	280	285
His Arg Pro Phe Leu Met Leu Gln Ala Arg Gln Ser Glu Asp His Pro			
	290	295	300
His Arg Arg Arg Arg Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Lys Val Asn Ile			
305	310	315	320
Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn			
	325	330	335
Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly			
	340	345	350
Glu Cys Pro Ser His Ile Ala Gly Thr Ser Gly Ser Ser Leu Ser Phe			
	355	360	365
His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe			
	370	375	380
Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser			
385	390	395	400
Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln			
	405	410	415
Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser			
	420	425	

<210> 227

<211> 340

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 227

Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu			
1	5	10	15
Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp			
	20	25	30
Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser Gly Thr Ile			
	35	40	45
Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp			

50	55	60
Arg Gln Glu Cys Val	Ala Thr Glu Glu Asn Pro	Gln Val Tyr Phe Cys
65	70	75
Cys Cys Glu Gly Asn Phe	Cys Asn Glu Arg Phe	Thr His Leu Pro Glu
85	90	95
Ala Gly Gly Pro Glu Val	Thr Tyr Glu Pro Pro	Pro Thr Ala Pro Ser
100	105	110
Gly Asp Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu Leu
115	120	125
Gly Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr Leu
130	135	140
Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser
145	150	155
His Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu
165	170	175
Val His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Tyr Asn Ser Thr
180	185	190
Tyr Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His	Gln Asp Trp Leu Asn
195	200	205
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys	Ala Leu Pro Ala Pro
210	215	220
Ile Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln	Pro Arg Glu Pro Gln
225	230	235
Val Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Asp Glu Leu	Thr Lys Asn Gln Val
245	250	255
Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val
260	265	270
Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr Pro
275	280	285
Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu Thr
290	295	300
Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser Val
305	310	315
Met His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu Ser Leu
325	330	335
Ser Pro Gly Lys		
340		
<210> 228		
<211> 407		

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 228

```

Met Asp Gly Leu Pro Gly Arg Ala Leu Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu
1           5           10           15
Leu Ala Ala Gly Trp Leu Gly Pro Glu Ala Trp Gly Ser Pro Thr Pro
           20           25           30
Pro Pro Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ser Pro
           35           40           45
Gly Gly Ser Gln Asp Thr Cys Thr Ser Cys Gly Gly Phe Arg Arg Pro
           50           55           60
Glu Glu Leu Gly Arg Val Asp Gly Asp Phe Leu Glu Ala Val Lys Arg
65           70           75           80
His Ile Leu Ser Arg Leu Gln Met Arg Gly Arg Pro Asn Ile Thr His
           85           90           95
Ala Val Pro Lys Ala Ala Met Val Thr Ala Leu Arg Lys Leu His Ala
           100          105          110
Gly Lys Val Arg Glu Asp Gly Arg Val Glu Ile Pro His Leu Asp Gly
           115          120          125
His Ala Ser Pro Gly Ala Asp Gly Gln Glu Arg Val Ser Glu Ile Ile
           130          135          140
Ser Phe Ala Glu Thr Asp Gly Leu Ala Ser Ser Arg Val Arg Leu Tyr
145          150          155          160
Phe Phe Ile Ser Asn Glu Gly Asn Gln Asn Leu Phe Val Val Gln Ala
           165          170          175
Ser Leu Trp Leu Tyr Leu Lys Leu Leu Pro Tyr Val Leu Glu Lys Gly
           180          185          190
Ser Arg Arg Lys Val Arg Val Lys Val Tyr Phe Gln Glu Gln Gly His
           195          200          205
Gly Asp Arg Trp Asn Met Val Glu Lys Arg Val Asp Leu Lys Arg Ser
           210          215          220
Gly Trp His Thr Phe Pro Leu Thr Glu Ala Ile Gln Ala Leu Phe Glu
225          230          235          240
Arg Gly Glu Arg Arg Leu Asn Leu Asp Val Gln Cys Asp Ser Cys Gln
           245          250          255
Glu Leu Ala Val Val Pro Val Phe Val Asp Pro Gly Glu Glu Ser His
           260          265          270
Arg Pro Phe Val Val Val Gln Ala Arg Leu Gly Asp Ser Arg His Arg
           275          280          285

```

Ile Arg Lys Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Arg Thr Asn Leu Cys Cys
 290 295 300
 Arg Gln Gln Phe Phe Ile Asp Phe Arg Leu Ile Gly Trp Asn Asp Trp
 305 310 315 320
 Ile Ile Ala Pro Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Glu Gly Ser Cys
 325 330 335
 Pro Ala Tyr Leu Ala Gly Val Pro Gly Ser Ala Ser Ser Phe His Thr
 340 345 350
 Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly Leu Asn Pro Gly Thr Val
 355 360 365
 Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Thr Met Ser Met Leu Tyr
 370 375 380
 Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp Val Pro Asn Met Ile
 385 390 395 400
 Val Glu Glu Cys Gly Cys Ala
 405

阻抗振幅：一种处理

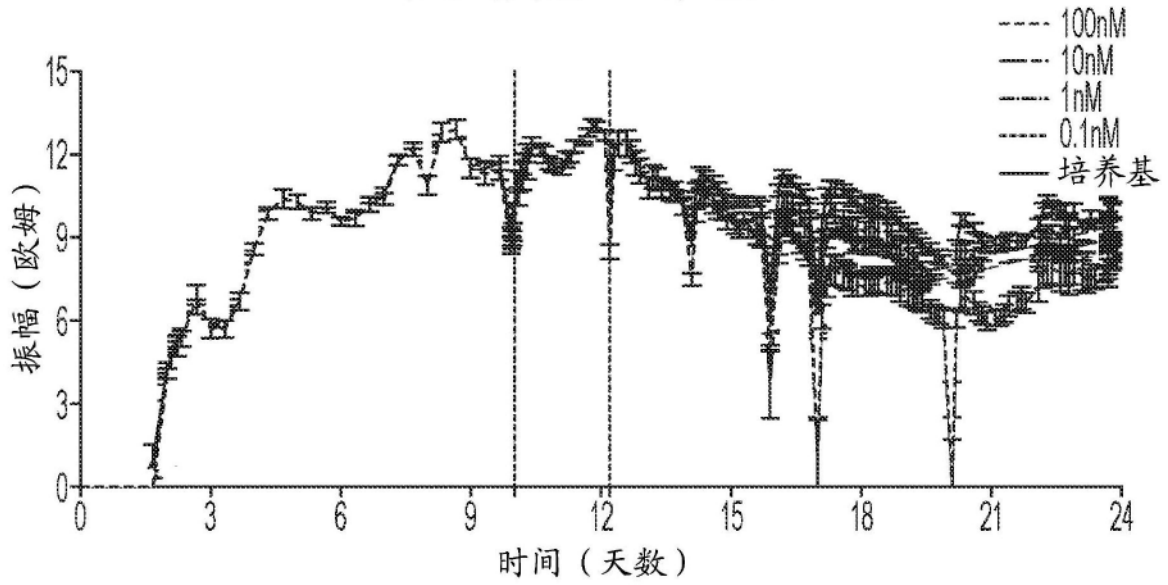


图1A

阻抗振幅：连续激活素A处理

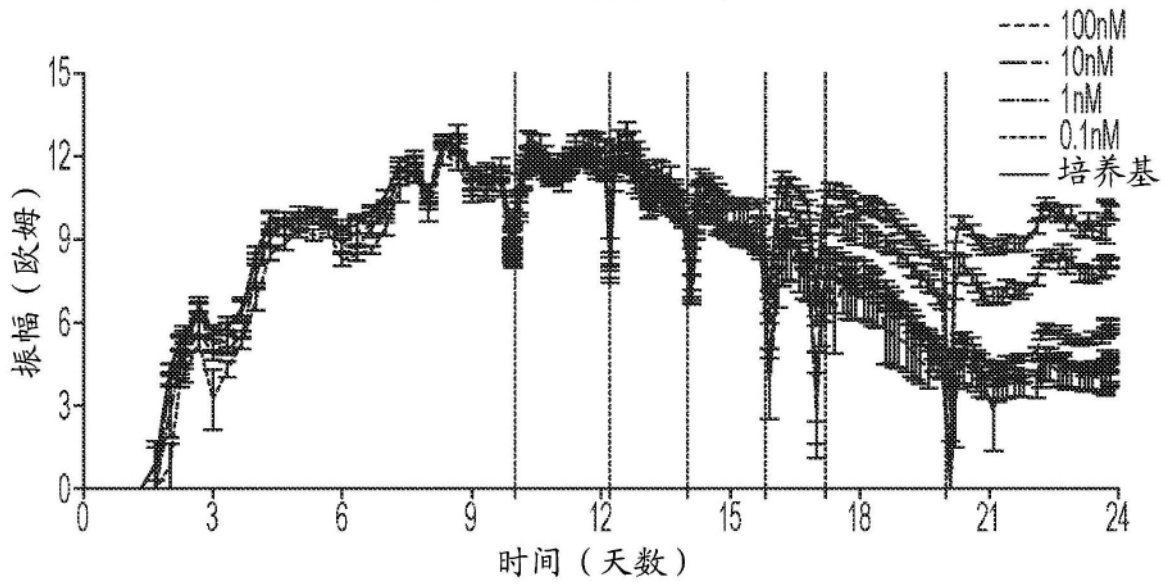


图1B

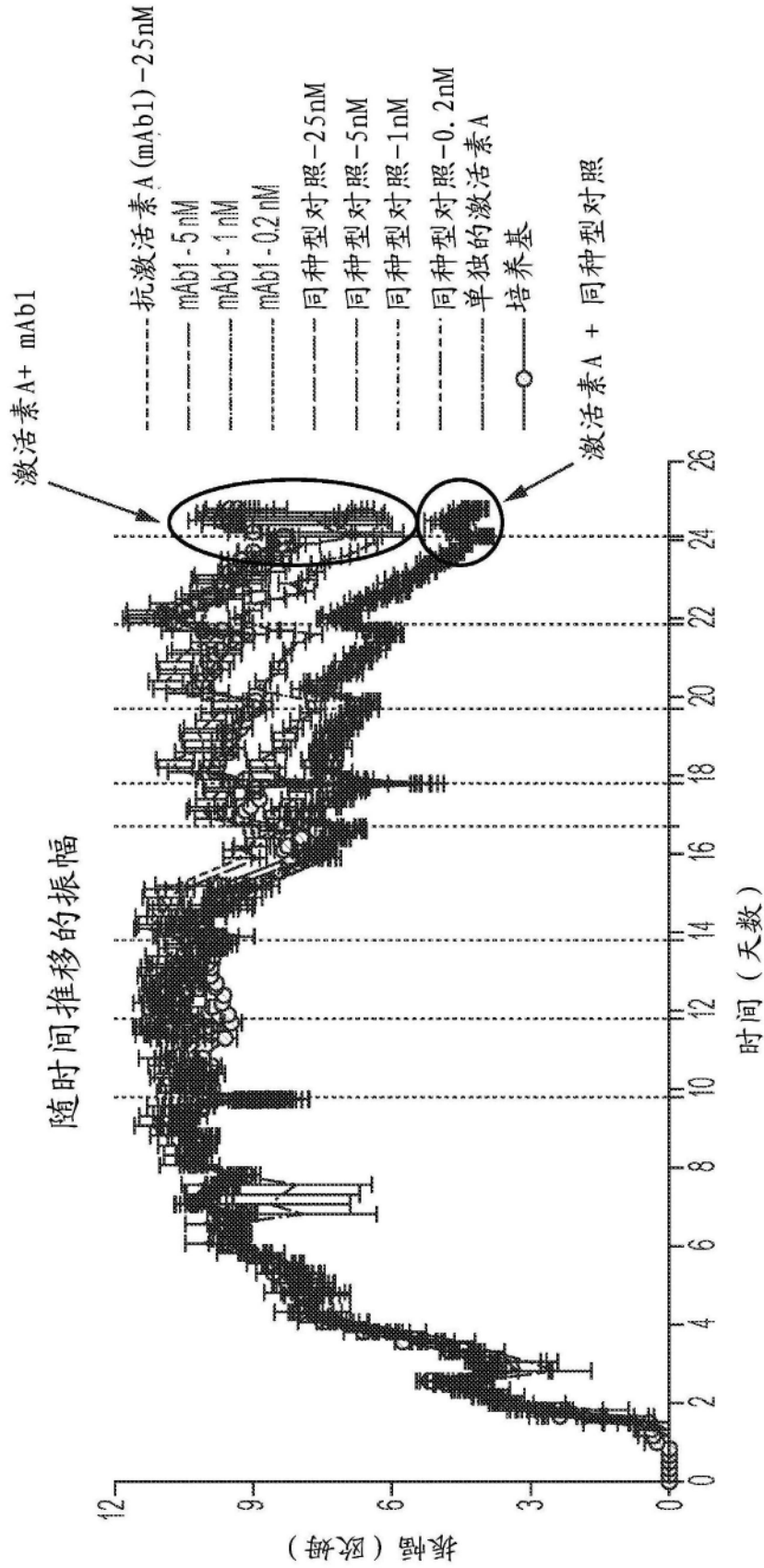


图2

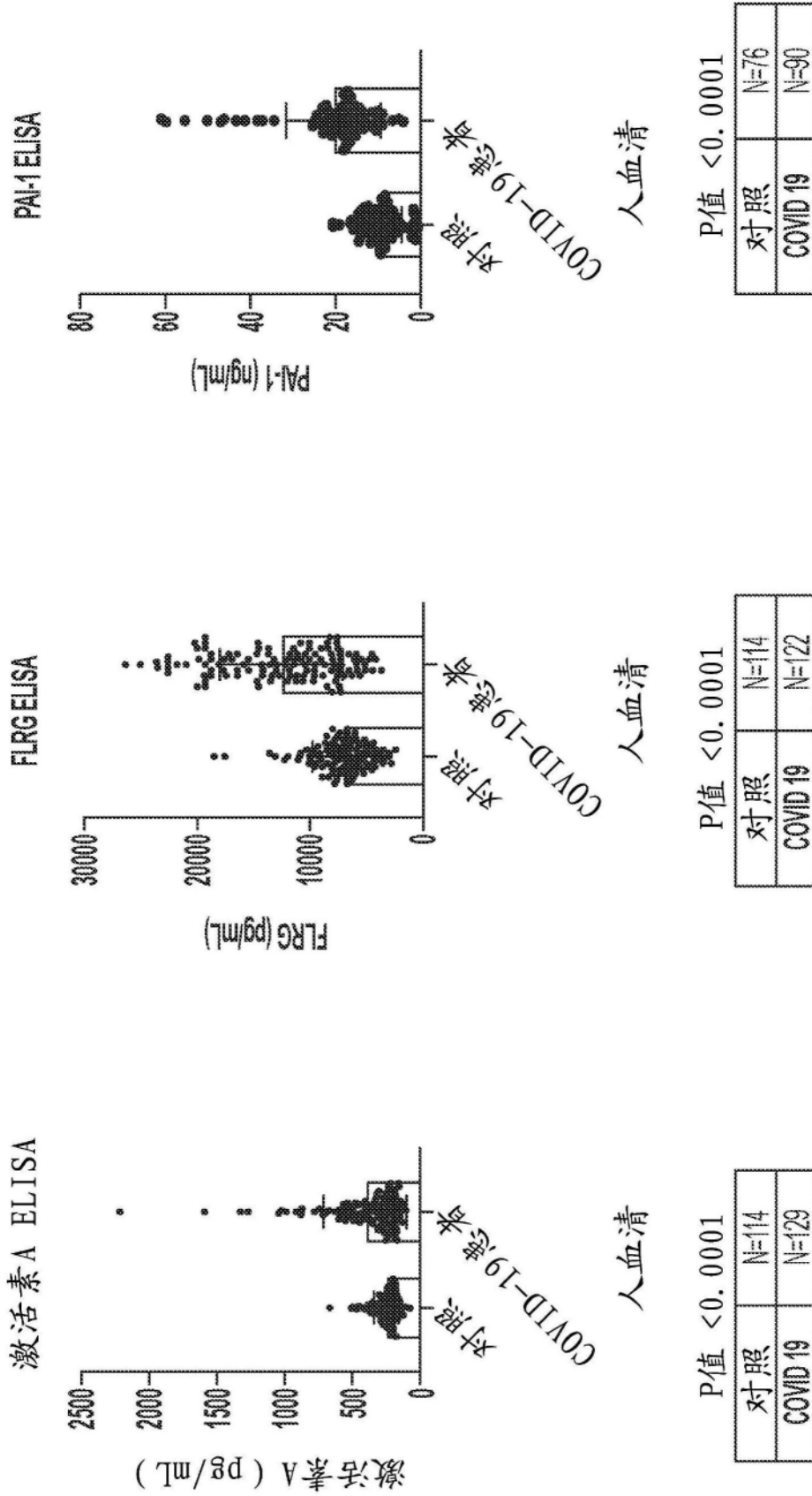


图3

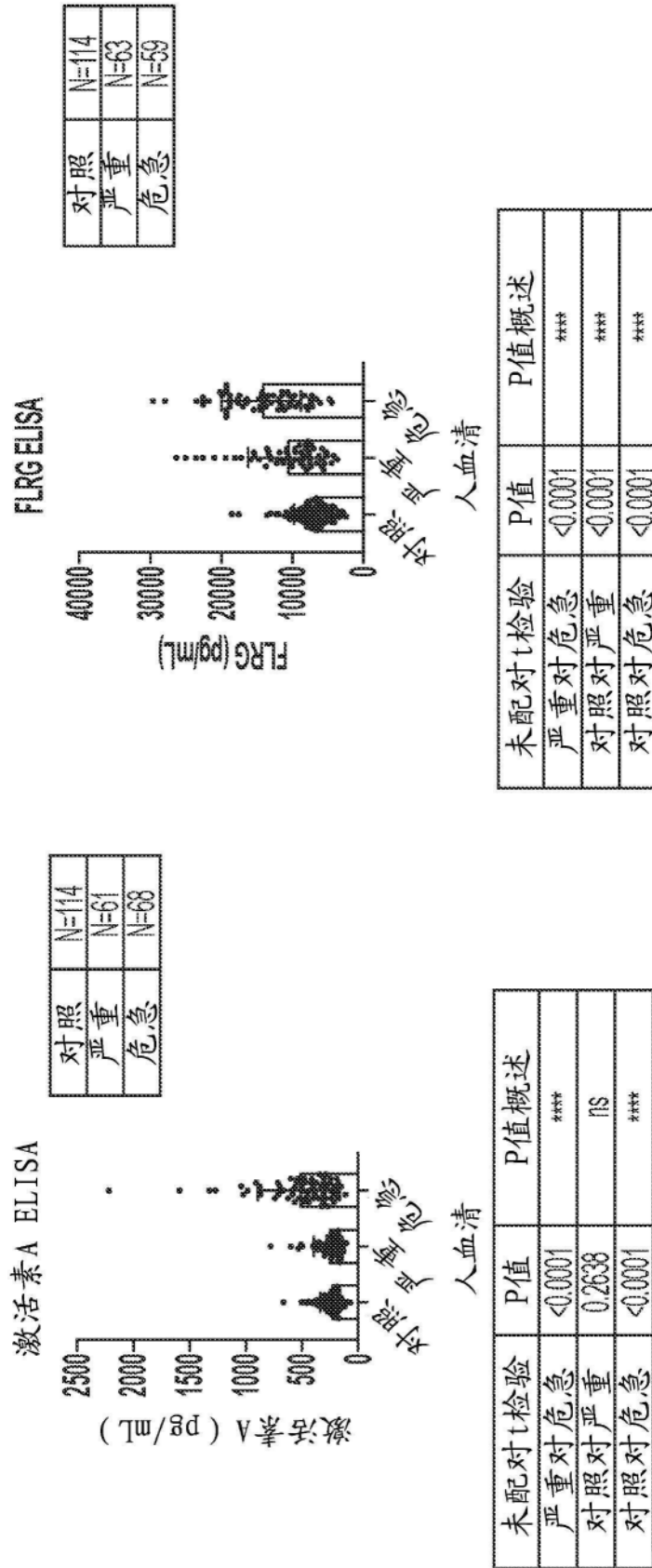


图4

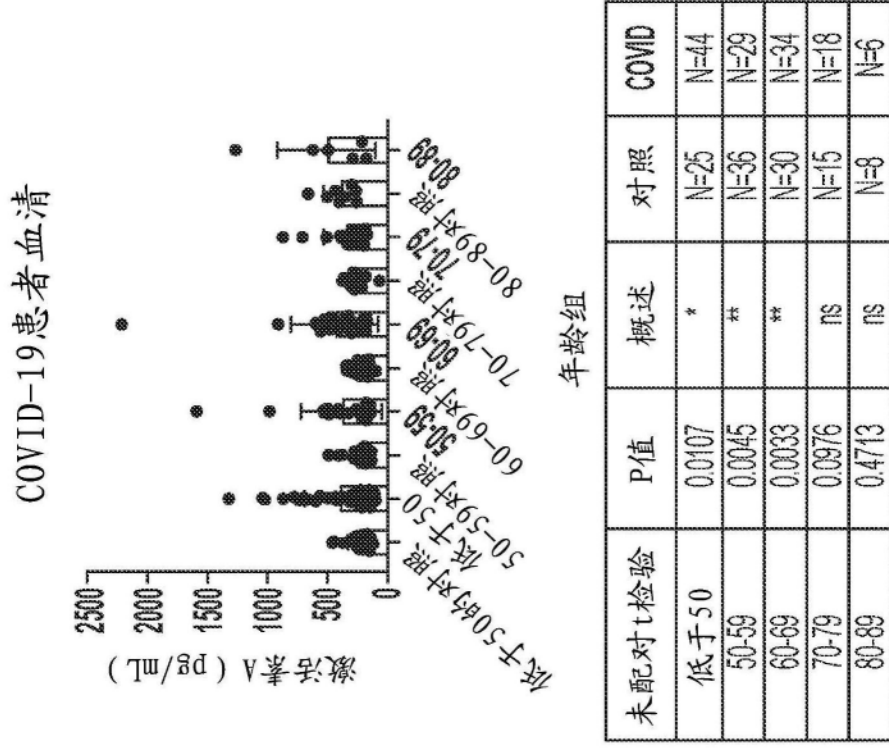
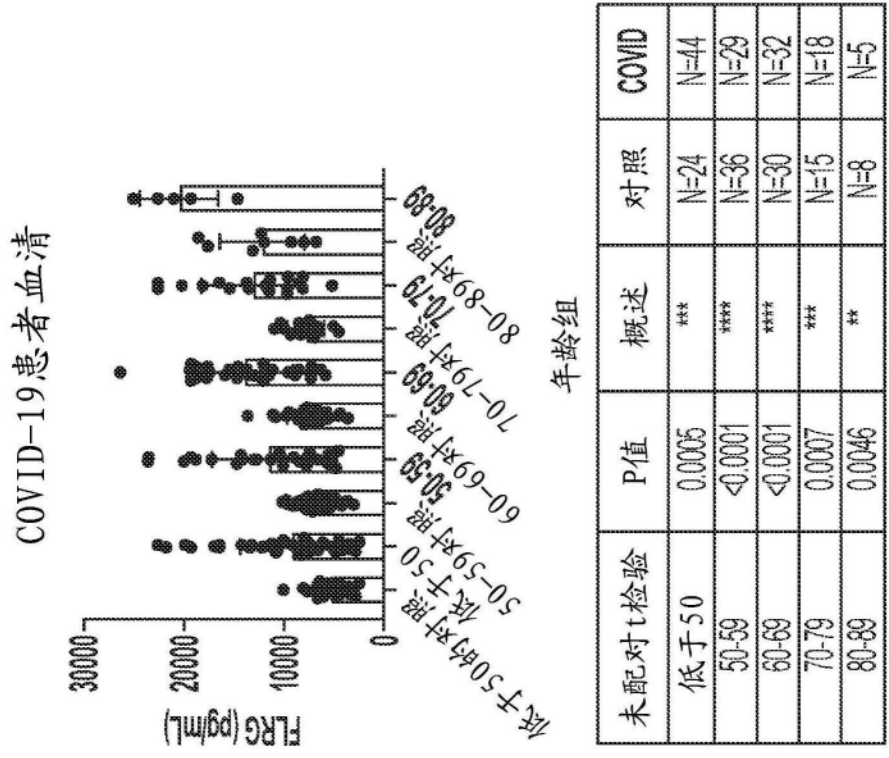
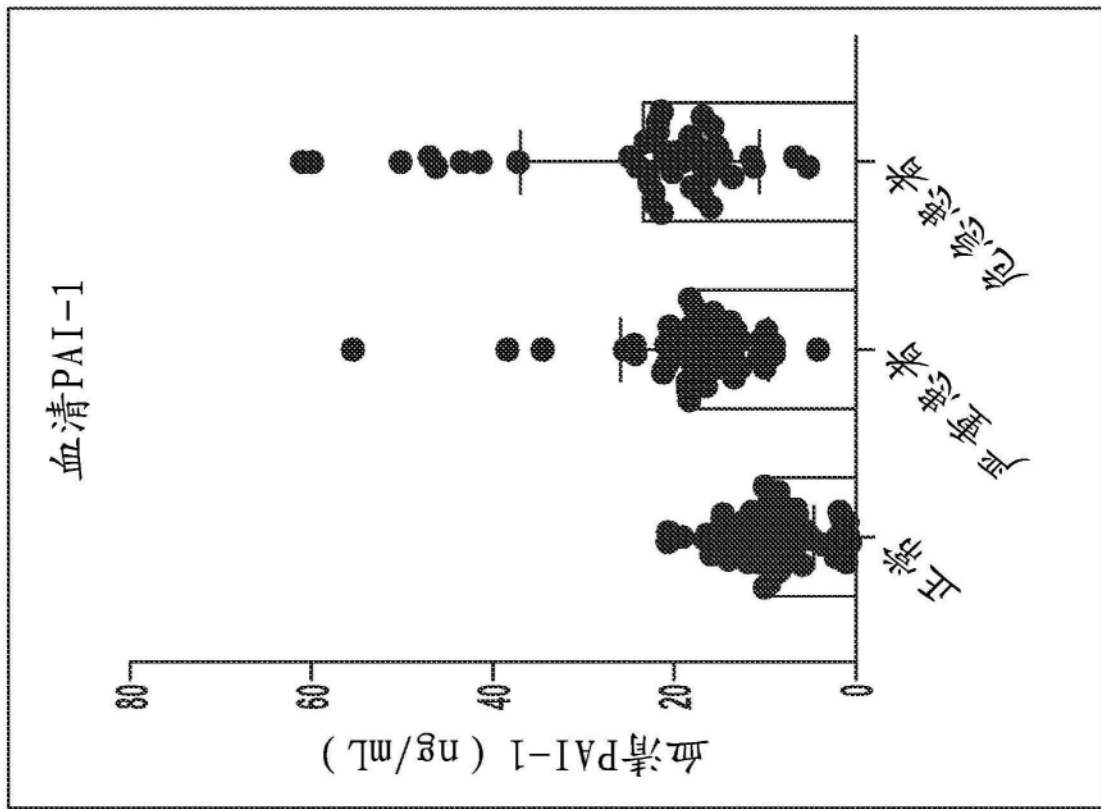


图5



	P值
正常对严重Covid 19	<0.0001
正常对危急Covid 19	<0.0001
严重对危急Covid 19	0.0101

图6

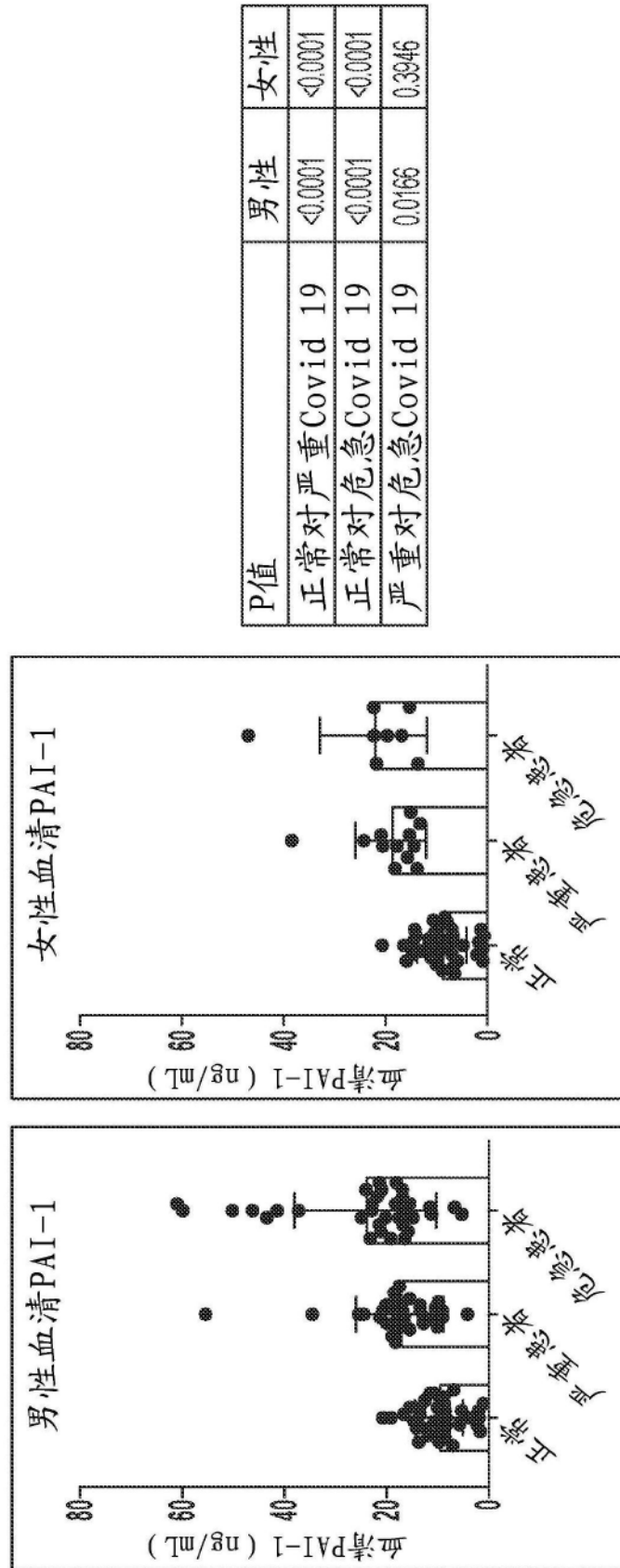
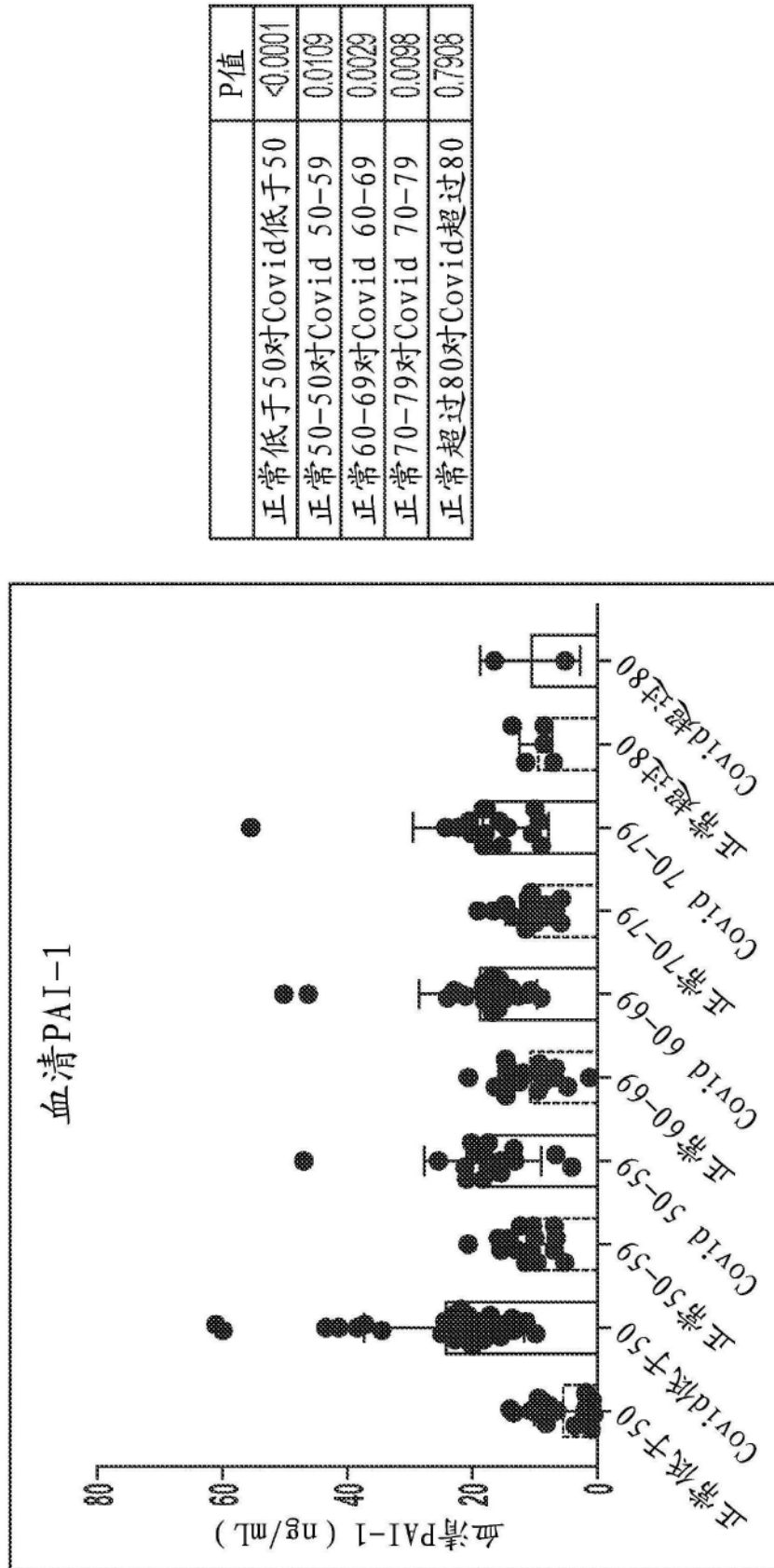


图7



	P值
正常低于50对Covid低于50	<0.0001
正常50-59对Covid 50-59	0.0109
正常60-69对Covid 60-69	0.0029
正常70-79对Covid 70-79	0.0098
正常超过80对Covid超过80	0.7908

图8

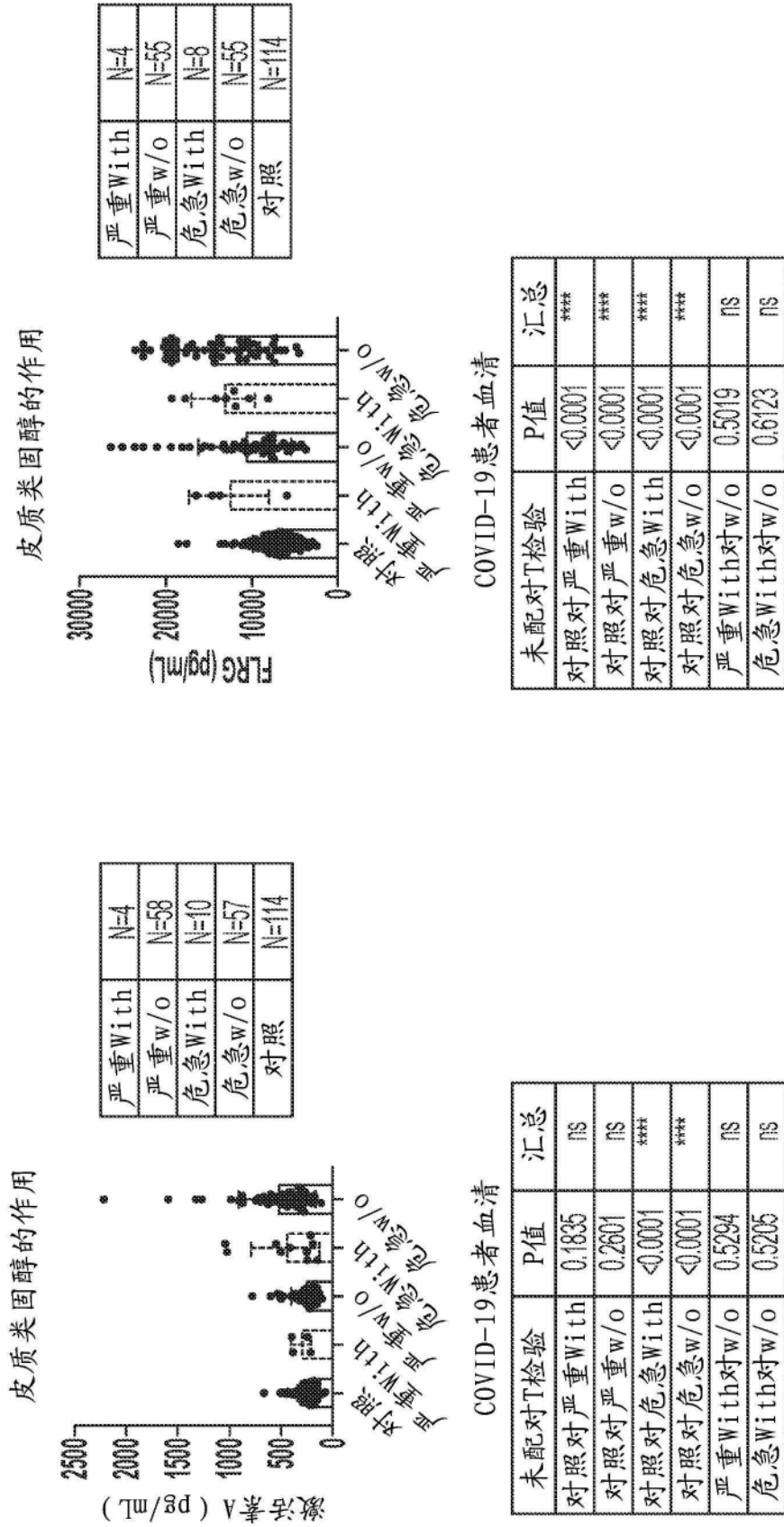


图9

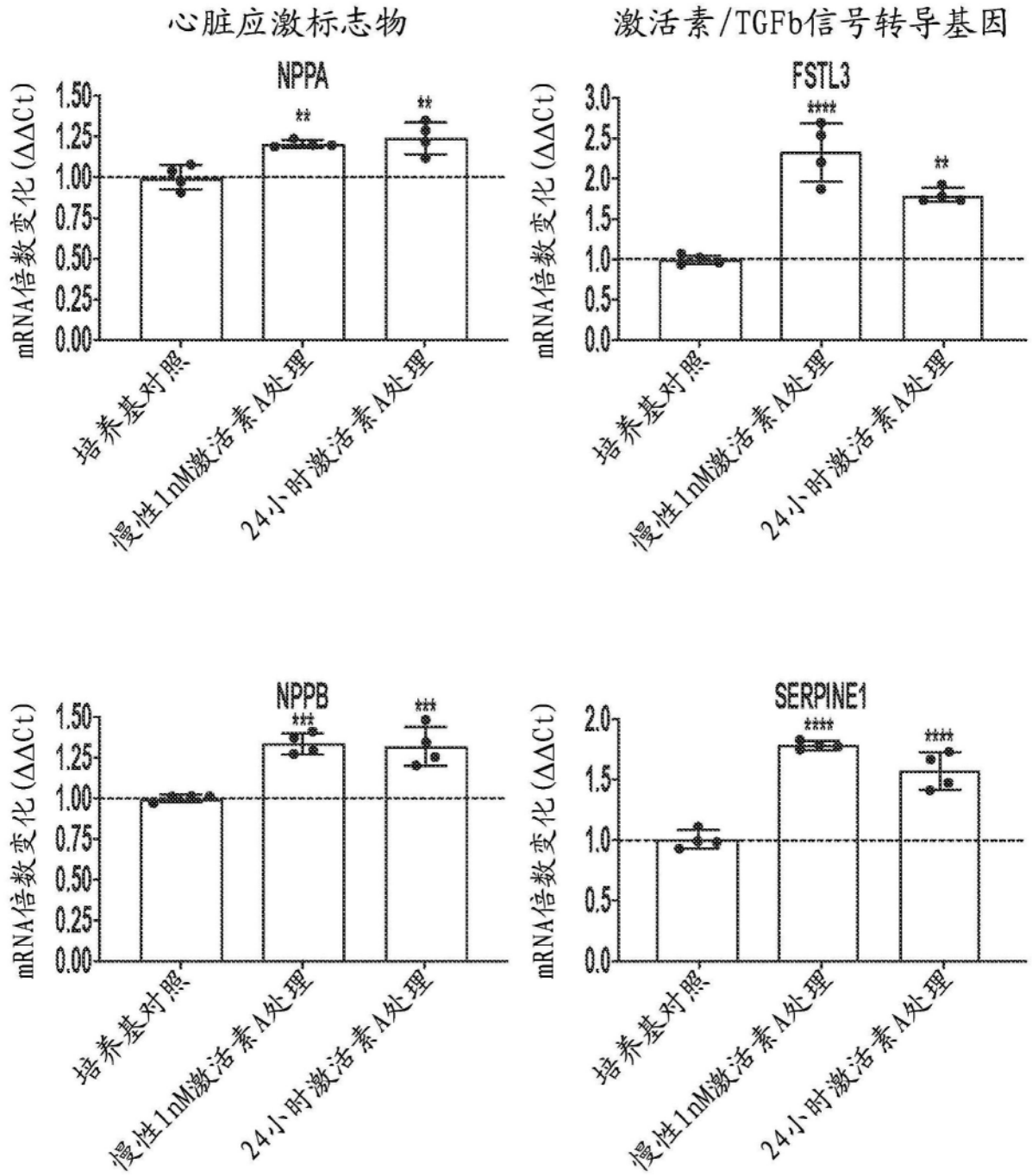


图10

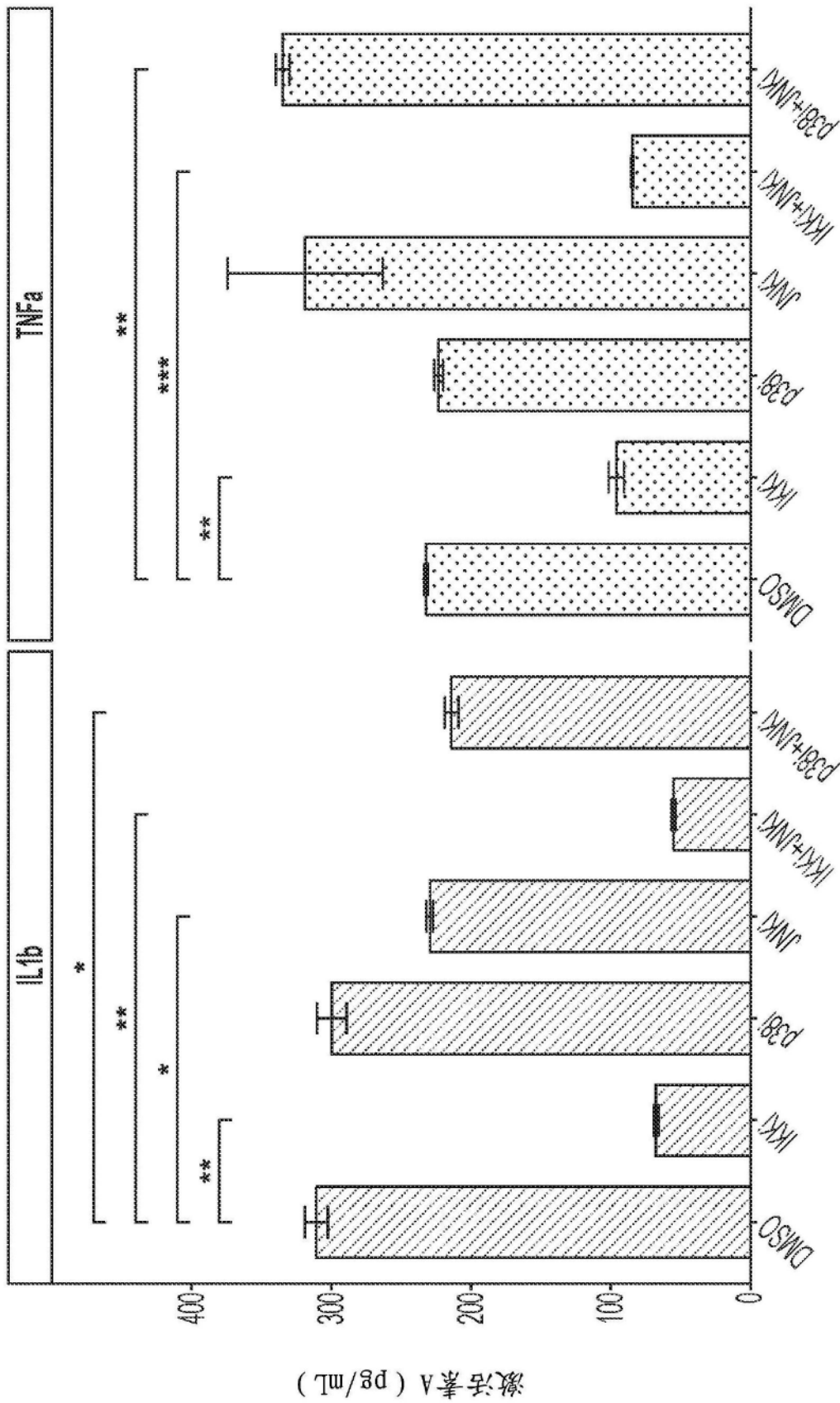


图11

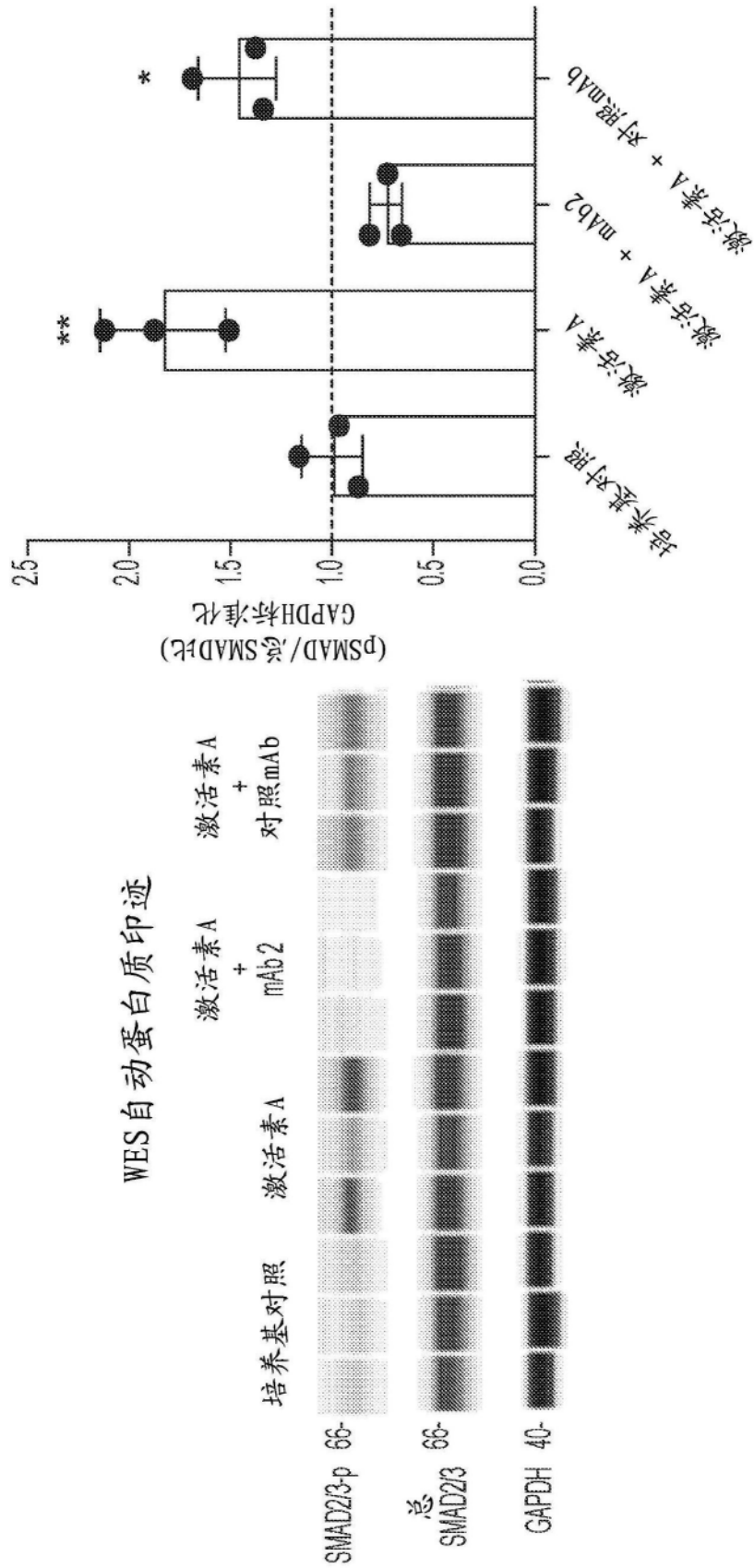


图12

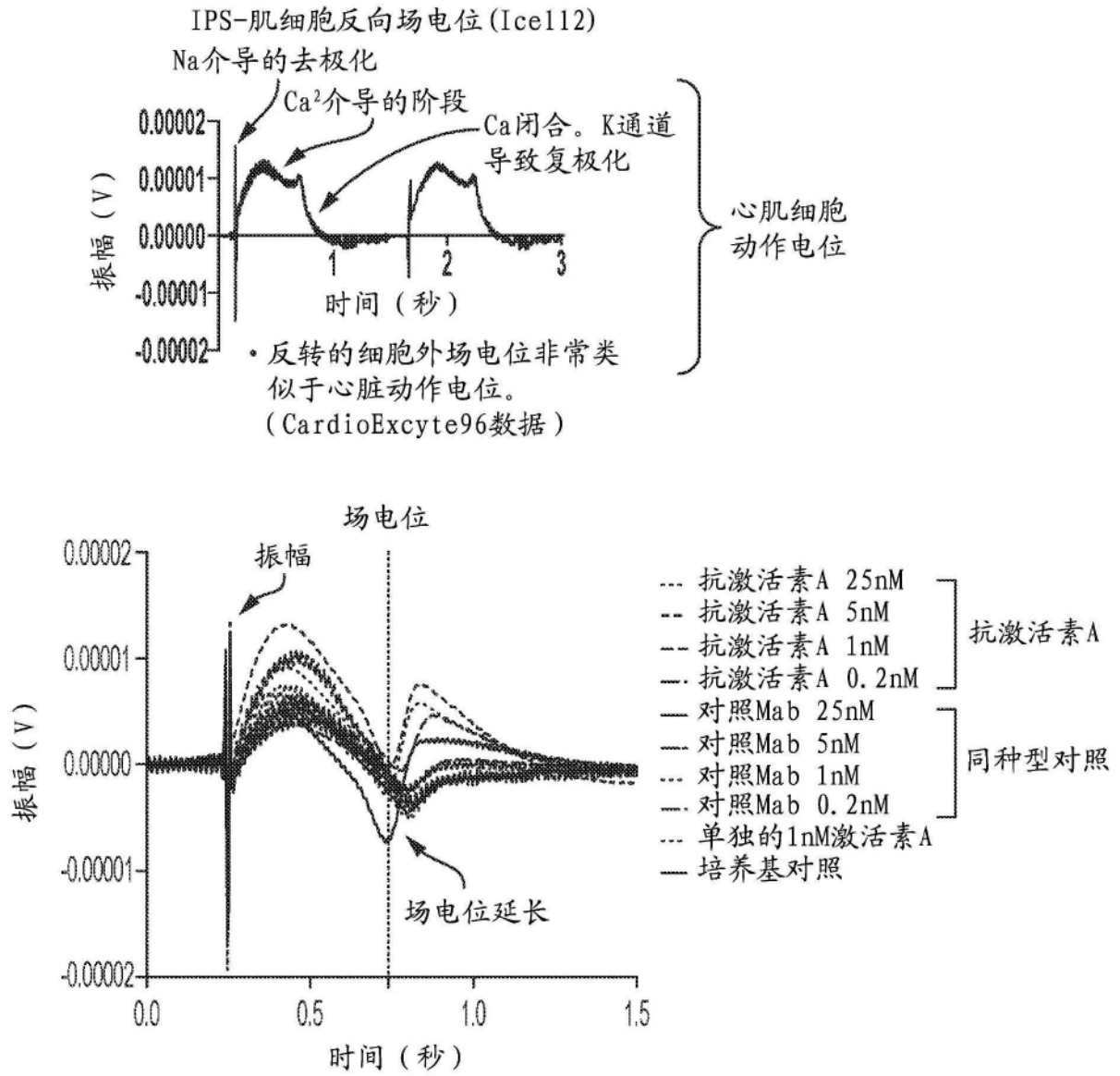


图13A

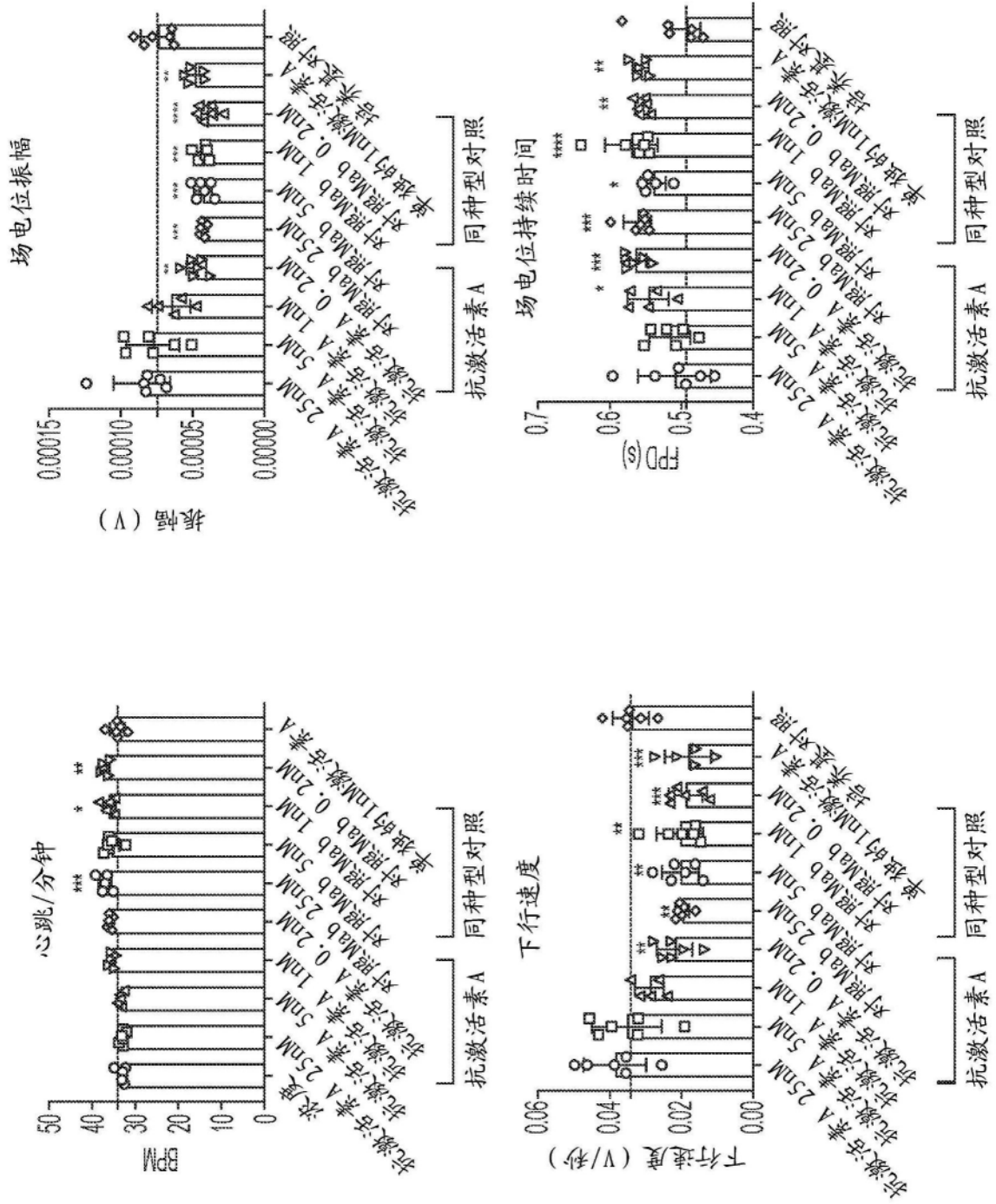


图13B

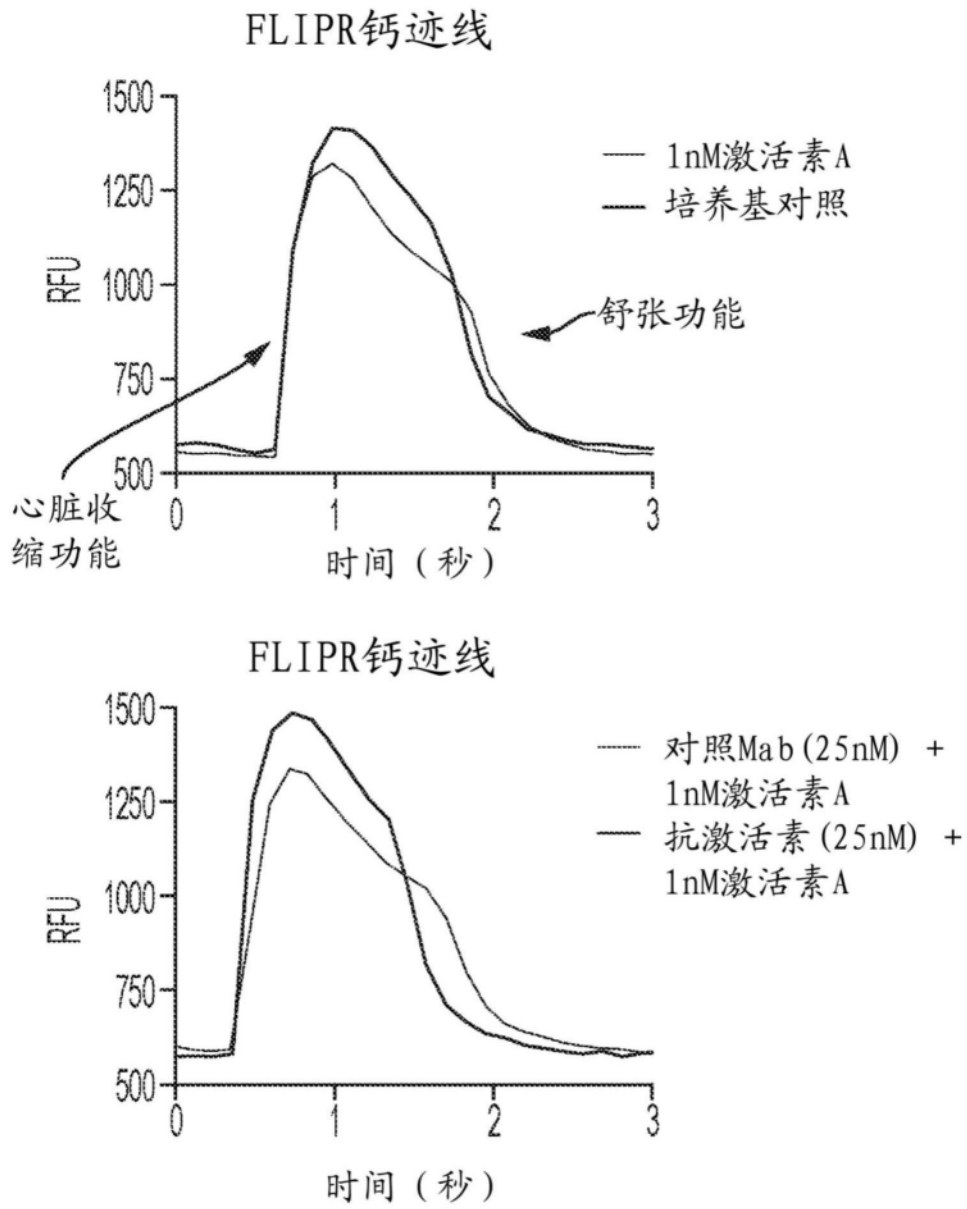


图14A

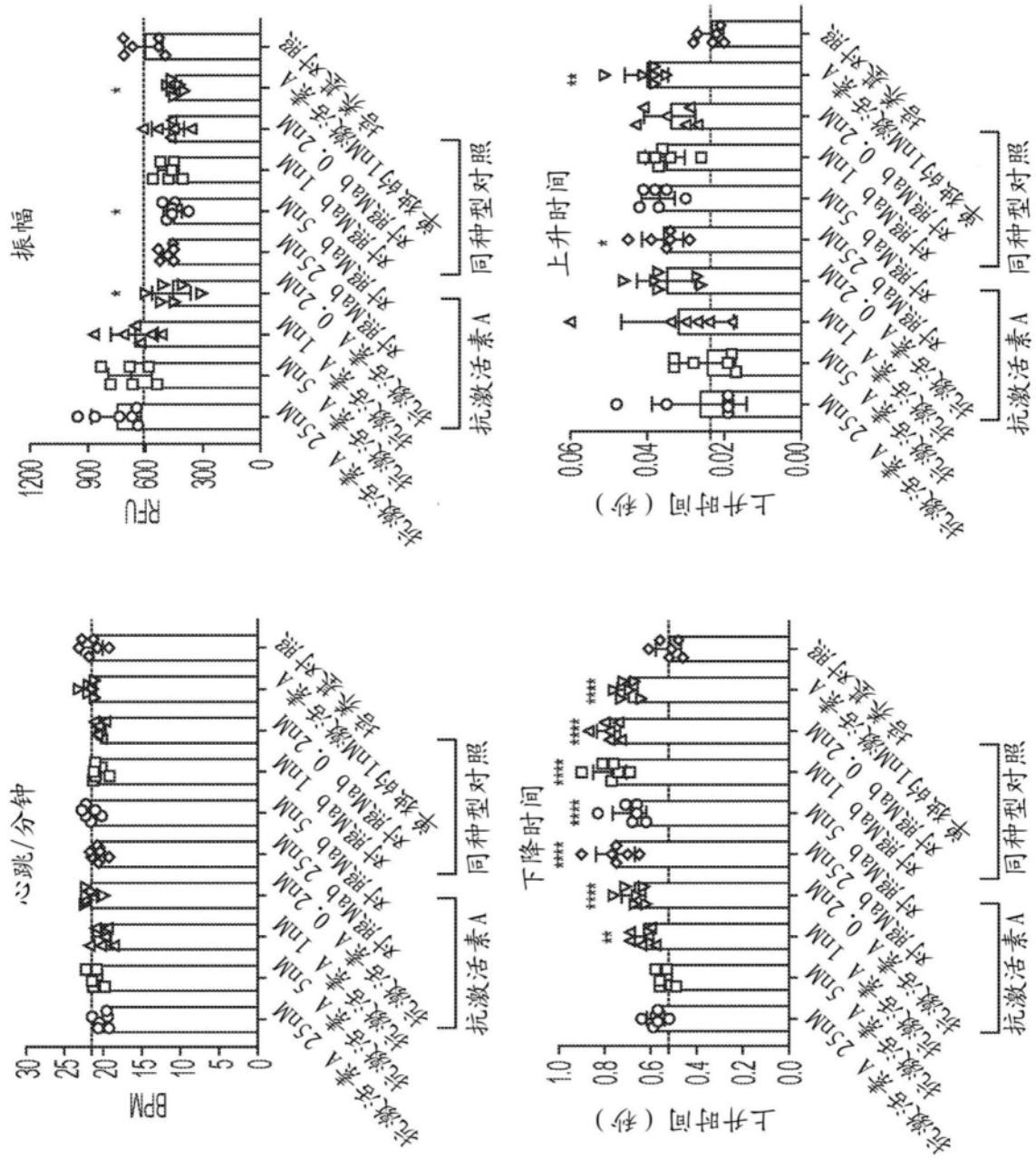


图14B