



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I472336 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：098127213

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 13 日

(51)Int. Cl. : **A61K38/16 (2006.01)****A61P7/00 (2006.01)**

(30)優先權：2008/08/14 美國

61/189,094

(71)申請人：艾瑟勒朗法瑪公司 (美國) ACCELERON PHARMA INC. (US)
美國(72)發明人：希勒 傑斯伯 SEEHRA, JASBIR (US)；泊索 羅柏特 史考特 PEARSALL,
ROBERT SCOTT (US)；庫瑪 瑞賓卓 KUMAR, RAVINDRA (US)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

(56)參考文獻：

TW 200846357

WO 2008/076437A2

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：46 項 圖式數：18 共 137 頁

(54)名稱

使用 GDF 阻以增加紅血球水平

USE OF GDF TRAPS TO INCREASE RED BLOOD CELL LEVELS

(57)摘要

在某些方面中，本發明提供在脊椎動物(包括齧齒動物及靈長類動物，且尤其人類)中增加紅血球及/或血紅素水平的組成物及方法。

In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for increasing red blood cell and/or hemoglobin levels in vertebrates, including rodents and primates, and particularly in humans.

ActRIIA
ActRIIBILGRS27QEC L[RE]NANWEKD RTNQQTGVEPC YGD[KD]K[R]HC F[AT]WKNISGS
GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGTIEIVKQGWL DDINCYPRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGWL DDFNQCYPRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEAEVTQOPTSNPV TPKPPT
GGPEVTYEPP PTAPT

3412-3425)，且小於 10% 之脊髓發育不良症候群患者反應良好 (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67)。雖然包括炎症、鐵及維生素缺乏、透析不足、鋁中毒及副甲狀腺機能亢進之若干因素可預示治療反應不良，但對 Epo 之抗性之分子機制至今仍不明朗。

因此，本發明之一目的在於提供增加患者紅血球水平的替代組成物及方法。

【發明內容】

部分而言，本發明說明 GDF 阵可用於增加紅血球及血紅素水平。相對於其他 ActRIIB 配位體 (諸如 GDF11 及/或肌肉抑制素 (myostatin)) 對活化素 (例如活化素 A 及/或活化素 B) 之親和力顯著較低之變異體 ActRIIB 多肽稱為 GDF 阵。除非另加說明，否則本文所述之 ActRIIB 變異體為 GDF 阵。詳言之，本發明說明在 SEQ ID NO: 1 之位置 79 處具有酸性殘基的可溶形式之 ActRIIB 多肽的 GDF 阵，其當活體內投予時增加血液中之紅血球水平。因此，在某些具體實例中，本發明提供使用 GDF 阵增加患者之紅血球及血紅素水平且治療有需要之患者的與低紅血球或血紅素水平相關之病症的方法。如美國專利申請案第 12/012,652 號 (其以引用的方式併入本文中) 中所述，GDF 阵可用於增加肌肉質量且減少脂肪質量。

在某些方面中，本發明提供為變異體 ActRIIB 多肽 (包括具有胺基末端及羧基末端截斷及序列變化之 ActRIIB 多肽) 的 GDF 阵。視情況，本發明之 GDF 阵可經設計以優先

拮抗 ActRIIB 受體之一或多個配位體，諸如 GDF8（亦稱為肌肉抑制素）、GDF11、Nodal 及 BMP7（亦稱為 OP-1）。GDF 阵之實例包括一組來源於 ActRIIB 且對活化素之親和力已大幅降低之變異體。此等變異體對紅血球展現所需作用，同時減少對其他組織之影響。該等變異體之實例包括在對應於 SEQ ID NO.1 之位置 79 處具有酸性胺基酸（例如天門冬胺酸 D 或麩胺酸 E）之變異體。在某些具體實例中，GDF 阵多肽包含以下胺基酸序列：包含 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列，由 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列所組成，或基本上由 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列所組成；以及與任一上述胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 一致之多肽。

在某些方面中，本發明提供包含與諸如 GDF8、GDF11、活化素（例如活化素 B）、BMP7 或 nodal 之 ActRIIB 配位體結合之 GDF 阵及醫藥學上可接受之載劑的醫藥製劑。視情況，GDF 阵以小於 10 微莫耳、小於 1 微莫耳、小於 100 奈莫耳、小於 10 奈莫耳、或小於 1 奈莫耳之 K_d 與 ActRIIB 配位體結合。視情況，GDF 阵抑制 ActRIIB 發訊，諸如由 ActRIIB 配位體觸發之細胞內訊號轉導事件。用於此類製劑之 GDF 阵可為本文所揭示之任一 GDF 阵，包括例如具有選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38 或 40 之胺基酸序列的 GDF 阵；或具有與選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38 或 40 之胺基酸序列至

少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%一致之胺基酸序列的 GDF 阵；或具有與選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38 或 40 之胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%一致之胺基酸序列的 GDF 阵，其中對應於 SEQ ID NO: 1 之 L79 的位置為酸性胺基酸。用於此類製劑之較佳 GDF 阵由 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列所組成，或基本上由 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列所組成。GDF 阵可包括天然 ActRIIB 多肽之功能片段，諸如包含選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38 或 40 之序列的至少 10 個、20 個或 30 個胺基酸之功能片段；或 C 末端缺乏 1、2、3、4、5 或 10 至 15 個胺基酸且 N 末端缺乏 1、2、3、4 或 5 個胺基酸之 SEQ ID NO: 2 序列。較佳之多肽相對於 SEQ ID NO: 2 或 40 在 N 末端包括 2 至 5 個胺基酸截斷且在 C 末端包括不超過 3 個胺基酸截斷。相對於天然產生之 ActRIIB 多肽，GDF 阵在 ActRIIB 多肽之胺基酸序列中（例如在配位體結合域中）可包括一或多個變化。舉例而言，相對於天然產生之 ActRIIB 多肽，胺基酸序列之變化可改變哺乳動物、昆蟲或其他真核細胞中所產生之多肽的糖基化或改變多肽之蛋白水解分裂。

GDF 阵可為具有 ActRIIB 多肽作為一個域（例如具有一或多個序列變異之 ActRIIB 配位體結合域）及一或多個提供所需性質（諸如改善之藥物動力學、較易純化、靶向特定組織等）之其他域的融合蛋白。舉例而言，融合蛋白之域可增強以下一或多者：活體內穩定性、活體內半生期、

攝取/投予、組織定位或分布、蛋白質複合物之形成、融合蛋白之多聚化、及/或純化。GDF 駛融合蛋白可包括免疫球蛋白 Fc 域（野生型或突變型）或血清白蛋白。在某些具體實例中，GDF 駛融合物包含位於 Fc 域與 ActRIIB 胞外域之間的相對無結構性連接子。此無結構性連接子可對應於在 ActRIIB 之胞外域之 C 末端（「尾」）處的約 15 個胺基酸無結構性區，或其可為 3 個與 5、15、20、30、50 或超過 50 個之間的相對不含二級結構之胺基酸的人工序列。連接子可富含甘胺酸及脯胺酸殘基，且可（例如）含有蘇胺酸/絲胺酸及甘胺酸之重複序列（例如，TG₄（SEQ ID NO: 13）或 SG₄（SEQ ID NO: 14）單一或重複）或一連串的三個甘胺酸。融合蛋白可包括純化子序列，諸如抗原決定基標籤、FLAG 標籤、聚組胺酸序列、及 GST 融合物。在某些具體實例中，GDF 駛融合物包含前導序列。前導序列可為原生 ActRIIB 前導序列或異源前導序列。在某些具體實例中，前導序列為組織纖維蛋白溶酶原活化子（TPA）前導序列。在一具體實例中，GDF 駛融合蛋白包含如式 A-B-C 所示之胺基酸序列。B 部分為由對應於 SEQ ID NO: 2 或 40 之胺基酸 25-131 之胺基酸序列所組成的 N 末端及 C 末端截斷的 ActRIIB 多肽。A 部分及 C 部分可獨立地為零個、一個或超過一個胺基酸，且 A 部分與 C 部分均與 B 異源。A 及/或 C 部分可經由連接子序列與 B 部分連接。

視情況，GDF 駛包括具有一或多個選自以下者之經修飾胺基酸殘基的變異體 ActRIIB 多肽：糖基化胺基酸、PEG

化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、生物素化胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸、及與有機衍生劑結合之胺基酸。醫藥製劑亦可包括一或多種其他化合物，諸如用於治療 ActRIIB 相關病症之化合物。醫藥製劑較佳實質上無熱原質。一般而言，GDF 阵較佳在介導 GDF 阵之適當天然糖基化的哺乳動物細胞系中表現，以減少患者產生不良免疫反應之可能性。已成功使用人類細胞系及 CHO 細胞系，且預期其他常見哺乳動物表現載體將適用。

在某些方面中，本發明提供包含本文所述之醫藥製劑且經標記用於增加人類之紅血球水平的封裝藥物。

在某些方面中，本發明提供 GDF 阵，其為包含經改變之配位體結合域（例如 GDF8 結合域）之可溶性 ActRIIB 多肽。舉例而言，具有經改變之配位體結合域的 GDF 阵可在人類 ActRIIB 之胺基酸殘基，諸如 E37、E39、R40、K55、R56、Y60、A64、K74、W78、L79、D80、F82 及 F101（編號係相對於 SEQ ID NO: 1）處包含一或多個突變。相對於 ActRIIB 受體之野生型配位體結合域，經改變之配位體結合域視情況可對諸如 GDF8/GDF11 之配位體的選擇性增加。為說明起見，本文中證實此等突變使經改變之配位體結合域對 GDF11（且因此，有可能對 GDF8）之選擇性增加超過對活化素之選擇性：K74Y、K74F、K74I、L79D、L79E、及 D80I。以下突變具有反效應，從而使活化素結合之比率增加超過 GDF11 結合之比率：D54A、K55A、L79A 及 F82A。總體（GDF11 及活化素）結合活性可藉由包括「尾」區或

(可能)包括無結構性連接子區及藉由使用 K74A 突變而增加。引起配位體結合親和力總體下降之其他突變包括：R40A、E37A、R56A、W78A、D80K、D80R、D80A、D80G、D80F、D80M 及 D80N。可將突變組合以達成所要效應。舉例而言，影響 GDF11:活化素結合之比率之許多突變對配位體結合具有總體負效應，且因此，此等突變可與一般增加配位體結合之突變組合以產生具有配位體選擇性之改良的結合蛋白。在一例示性具體實例中，GDF 阵為包含視情況與其他胺基酸取代、添加或缺失組合之 L79D 或 L79E 突變的 ActRIIB 多肽。

視情況，包含經改變之配位體結合域之 GDF 阵的活化素結合之 K_d 與 GDF8 結合之 K_d 的比率為野生型配位體結合域之比率的至少 2 倍、5 倍、10 倍或甚至 100 倍。視情況，包含經改變之配位體結合域之 GDF 阵的抑制活化素之 IC_{50} 與抑制 GDF8/GDF11 之 IC_{50} 的比率為野生型 ActRIIB 配位體結合域之至少 2 倍、5 倍、10 倍或甚至 100 倍。視情況，包含經改變之配位體結合域的 GDF 阵以至少為抑制活化素之 IC_{50} 的二分之一、五分之一、十分之一或甚至百分之一的 IC_{50} 抑制 GDF8/GDF11。此等 GDF 阵可為包括免疫球蛋白 Fc 域（野生型或突變型）之融合蛋白。在某些狀況下，本發明之可溶性 GDF 阵為 GDF8 及/或 GDF11 之拮抗劑（抑制劑）。

本發明涵蓋其他 GDF 阵，諸如以下者。一種 GDF 阵融合蛋白，其包含來源於 SEQ ID NO: 1 或 39 之 ActRIIB 序列

之部分及第二多肽部分，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 21-29 中之任一者起始（視情況以 SEQ ID NO: 1 或 39 之 22-25 起始）且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 109-134 中之任一者終止的序列，且其中該 GDF 鮮融合蛋白在基於細胞之檢定中抑制藉由活化素、肌肉抑制素及/或 GDF11 之發訊。上述 GDF 鮮融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-29 中之任一者起始（視情況以 SEQ ID NO: 1 或 39 之 22-25 起始）且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 109-133 中之任一者終止的序列。上述 GDF 鮮融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-24 中之任一者起始（視情況以 SEQ ID NO: 1 或 39 之 22-25 起始）且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 109-133 中之任一者終止的序列。上述 GDF 鮮融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 21-24 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 109-134 中之任一者終止的序列。上述 GDF 鮮融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-24 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 118-133 中之任一者終止的序列。上述 GDF 鮮融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 21-24 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 118-134 中之任一者終止的序列。上述 GDF 鮮融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ

ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-24 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 128-133 中之任一者終止的序列。上述 GDF 阵融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-24 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 128-133 中之任一者終止的序列。上述 GDF 阵融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 21-29 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 118-134 中之任一者終止的序列。上述 GDF 阵融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-29 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 118-133 中之任一者終止的序列。上述 GDF 阵融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 21-29 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 128-134 中之任一者終止的序列。上述 GDF 阵融合蛋白，其中該來源於 ActRIIB 之部分對應於以 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 20-29 中之任一者起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 128-133 中之任一者終止的序列。令人驚訝的是，以 SEQ ID NO: 1 或 39 之 22-25 起始之構築體的活性水平高於具有人類 ActRIIB 之完整胞外域之蛋白質。在一較佳具體實例中，GDF 阵融合蛋白包含以下胺基酸序列，基本上由以下胺基酸序列所組成，或由以下胺基酸序列所組成：以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸位置 25 起始且以 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸位置 131 終止的胺基酸序列。在另一較佳具體實

例中，GDF 阈多肽由 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列所組成，或基本上由 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列所組成。任一上述 GDF 阈融合蛋白可以同元二聚體形式產生。任一上述 GDF 阈融合蛋白可具有包含來自 IgG 重鏈之恆定區（諸如 Fc 域）的異源部分。任一上述 GDF 阈融合蛋白可在對應於 SEQ ID NO: 1 之位置 79 處包含酸性胺基酸，視情況與一或多個相對於 SEQ ID NO: 1 之其他胺基酸取代、缺失或插入組合。

本發明涵蓋其他 GDF 阈蛋白，諸如以下。一種 GDF 阈蛋白，其包含與 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 29-109 之序列至少 80%一致的胺基酸序列，其中對應於 SEQ ID NO: 1 之 64 的位置為 R 或 K，且其中該 GDF 阈蛋白在基於細胞之檢定中抑制藉由活化素、肌肉抑制素及/或 GDF11 之發訊。上述 GDF 阈蛋白，其中至少一個相對於 SEQ ID NO: 1 或 39 之序列的變化係位於配位體結合阱 (ligand-binding pocket) 外部。上述 GDF 阈蛋白，其中至少一個相對於 SEQ ID NO: 1 或 39 之序列的變化為位於配位體結合阱內部之保守性變化。上述 GDF 阈蛋白，其中至少一個相對於 SEQ ID NO: 1 或 39 之序列的變化為在一或多個選自由 K74、R40、Q53、K55、F82 及 L79 所組成之群組之位置處的變化。上述 GDF 阈蛋白，其中該蛋白在除 ActRIIB 之內源 N-X-S/T 序列以外之位置處及配位體結合阱外部之位置處包含至少一個 N-X-S/T 序列。

本發明涵蓋其他 GDF 阈，諸如以下。一種 GDF 阈蛋白，

其包含與 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 29-109 之序列至少 80% 一致的胺基酸序列，且其中該蛋白在除 ActRIIB 之內源 N-X-S/T 序列以外之位置處及配位體結合阱外部之位置處包含至少一個 N-X-S/T 序列。上述 GDF 阵，其中該 GDF 阵蛋白在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 24 處包含 N，且在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 26 處包含 S 或 T，且其中該 GDF 阵在基於細胞之檢定中抑制藉由活化素、肌肉抑制素及/或 GDF11 之發訊。上述 GDF 阵，其中該 GDF 阵蛋白在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 64 處包含 R 或 K。上述 GDF 阵，其中該 ActRIIB 蛋白在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 79 處包含 D 或 E，且其中該 GDF 阵在基於細胞之檢定中抑制藉由活化素、肌肉抑制素及/或 GDF11 之發訊。上述 GDF 阵，其中至少一個相對於 SEQ ID NO: 1 或 39 之序列的變化為位於配位體結合阱內部之保守性變化。上述 GDF 阵，其中至少一個相對於 SEQ ID NO: 1 或 39 之序列的變化為在一或多個選自由 K74、R40、Q53、K55、F82 及 L79 所組成之群組之位置處的變化。上述 GDF 阵，其中該蛋白為進一步包含異源部分之融合蛋白。任一上述 GDF 阵融合蛋白可以同元二聚體形式產生。任一上述 GDF 阵融合蛋白可具有包含來自 IgG 重鏈之恆定區（諸如 Fc 域）的異源部分。

在某些方面中，本發明提供編碼 GDF 阵多肽之核酸。經分離多核苷酸可包含可溶性 GDF 阵多肽（諸如上文所述）之編碼序列。舉例而言，若無位於跨膜域或細胞質域內或

位於胞外域與跨膜域或細胞質域之間的終止密碼子，則經分離核酸可包括編碼包含具有一或多個序列變異之 ActRIIB 多肽之胞外域（例如配位體結合域）之 GDF 駛的序列及編碼 ActRIIB 多肽之一部分或所有跨膜域及/或細胞質域的序列。舉例而言，編碼 GDF 駛之經分離多核苷酸可包含全長 ActRIIB 多核苷酸序列（諸如具有一或多個變異之 SEQ ID NO: 4）或部分截斷型式，該經分離多核苷酸在 3'-末端之前至少 600 個核苷酸處否則在使該多核苷酸之轉譯產生視情況與全長 ActRIIB 之截斷部分融合的胞外域的位置處進一步包含轉錄終止密碼子。本文所揭示之核酸可與供表現用之啟動子可操作性地連接，且本發明提供經該等重組多核苷酸轉型之細胞。細胞較佳為哺乳動物細胞，諸如 CHO 細胞。

在某些方面中，本發明提供製造 GDF 駛多肽之方法。此類方法可包括在適宜之細胞（諸如中國倉鼠卵巢（CHO）細胞）中表現本文中所揭示之任一核酸（例如，SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31）。此類方法可包含：a) 在適於表現 GDF 駛多肽之條件下培養細胞，其中該細胞係經 GDF 駛表現構築體轉型；及 b) 回收如此表現之 GDF 駛多肽。可使用自細胞培養物獲得蛋白質之任一熟知技術來回收呈粗產物、經部分純化部分或經高度純化部分之 GDF 駛多肽。

在某些方面中，本文所揭示之 GDF 駛多肽可用於促進個體產生紅血球或增加個體之紅血球水平的方法。在某些具體實例中，本發明提供在有需要之患者中，治療與低紅

血球計數或低血紅素水平相關之病症（例如貧血）、或促進有需要之患者產生紅血球的方法。一種方法可包含向有需要之個體投予有效量之 GDF 隅多肽。在某些方面中，本發明提供 GDF 隅多肽之用途，其係用於製造供治療如本文所述之病症或病狀用的醫藥品。

在某些方面中，本發明提供向患者投予 GDF 隅多肽之方法。部分而言，本發明說明 GDF 隅多肽可用於增加紅血球及血紅素水平。GDF 隅多肽亦可用於治療或預防其他治療性應用，諸如促進肌肉生長。在某些情況下，當投予 GDF 隅多肽以促進肌肉生長時，可能需要在投予 GDF 隅多肽期間監控對紅血球之作用，或決定或調整 GDF 隅多肽之劑量，以降低對紅血球之不當作用。舉例而言，紅血球水平、血紅素水平、或血容比水平增加可能導致血壓升高。

【實施方式】

1. 概述

轉型生長因子 β (TGF- β) 超家族含有多種共享通用序列元件及結構基元之生長因子。已知此等蛋白質對脊椎動物與無脊椎動物中之多種細胞類型發揮生物作用。該超家族之成員在胚胎發育期間在模式形成及組織特異化方面執行重要功能，且可影響多種分化過程，包括脂肪生成、肌生成、軟骨生成、心臟生成、紅血球生成、神經生成及上皮細胞分化。該家族分成兩個一般分支：BMP/GDF 分支及 TGF- β /活化素/BMP10 分支，其成員具有互異且通常互補之作用。藉由操縱 TGF- β 家族成員之活性，常常有可能在生

物體中產生顯著生理變化。舉例而言，皮埃蒙特牛 (Piedmontese cattle) 及比利時藍牛 (Belgian Blue cattle) 品種在 GDF8 (亦稱為肌肉抑制素) 基因中帶有引起肌肉質量顯著增加之功能喪失性突變。Grobet 等人, *Nat Genet.* 1997, 17(1):71-4。此外，在人類中，GDF8 之失活等位基因與肌肉質量增加相關，且據報導與異常強度相關。Schuelke 等人, *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8。

TGF- β 信號係由 I 型絲胺酸/蘇胺酸激酶受體與 II 型絲胺酸/蘇胺酸激酶受體之異聚複合物介導，該等異聚複合物受配位體刺激後即磷酸化並活化下游 Smad 蛋白 (Massagué, 2000, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178)。此等 I 型受體及 II 型受體為跨膜蛋白，其由具有半胱胺酸富含區之配位體結合胞外域、跨膜域及具有預測絲胺酸/蘇胺酸特異性之細胞質域構成。I 型受體為發訊所必需。II 型受體為結合配位體及表現 I 型受體所需。I 型活化素受體與 II 型活化素受體在結合配位體之後形成穩定複合物，使得 I 型受體經 II 型受體磷酸化。

兩種相關的 II 型受體 (ActRII) -ActRIIA 及 ActRIIB 已經鑑別為活化素之 II 型受體 (Mathews 及 Vale, 1991, *Cell* 65:973-982; Attisano 等人, 1992, *Cell* 68: 97-108)。除活化素以外，ActRIIA 及 ActRIIB 可與若干其他 TGF- β 家族蛋白以生物化學方式相互作用，包括 BMP7、Nodal、GDF8 及 GDF11 (Yamashita 等人, 1995, *J. Cell Biol.* 130:217-226; Lee 及 McPherron, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

98:9306-9311; Yeo 及 Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957; Oh 等人, 2002, Genes Dev. 16:2749-54)。ALK4 為活化素(尤其活化素 A)之主要 I 型受體, 而 ALK-7 亦可充當活化素(尤其活化素 B)之受體。在某些具體實例中, 本發明係關於用本發明之 GDF 隅多肽來拮抗 ActRIIB 受體之配位體(亦稱為 ActRIIB 配位體)。ActRIIB 受體之例示性配位體包括一些 TGF- β 家族成員, 諸如活化素、Nodal、GDF8、GDF11 及 BMP7。

活化素為屬於 TGF- β 超家族之二聚多肽生長因子。存在三種主要活化素形式 (A、B 及 AB), 該三種形式為兩種緊密相關之 β 次單元的同元二聚體/異元二聚體 (分別為 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 及 $\beta_A\beta_B$)。人類基因組亦編碼主要在肝中表現之活化素 C 及活化素 E, 且亦已知含有 β_C 或 β_E 之異源二聚形式。在 TGF- β 超家族中, 活化素為獨特且多功能之因子, 其可刺激卵巢細胞及胎盤細胞中產生激素, 支持神經元細胞存活, 視細胞類型而正向或負向影響細胞週期進程, 且誘導至少兩棲動物胚胎中之中胚層分化 (DePaolo 等人, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson 等人, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963)。此外, 據發現, 自經刺激之人類單核白血病細胞分離之紅血球分化因子(EDF)與活化素 A 相同 (Murata 等人, 1988, PNAS, 85:2434)。已提出活化素 A 促進骨髓中之紅血球生成。在若干組織中, 活化素發訊受其相關異元二聚體-抑制素拮抗。舉例而言, 在自垂體釋放促卵泡激素

(FSH) 期間，活化素促進 FSH 分泌及合成，而抑制素阻止 FSH 分泌及合成。可調節活化素生物活性及/或與活化素結合之其他蛋白質包括卵泡抑素 (follistatin, FS)、卵泡抑素相關蛋白 (FSRP) 及 α_2 -巨球蛋白。

Nodal 蛋白具有在胚胎形成早期誘導及形成中胚層及內胚層且隨後組織中軸結構 (諸如心臟及胃) 的功能。已證實脊組織在脊椎動物胚胎發育中主要對脊索及脊索前板之中軸結構作貢獻，同時其募集周圍細胞以形成非中軸胚胎結構。Nodal 似乎經由 I 型受體與 II 型受體及稱為 Smad 蛋白之細胞內效應子發訊。新近研究支持 ActRIIA 及 ActRIIB 充當 Nodal 之 II 型受體的觀點 (Sakuma 等人, *Genes Cells*. 2002, 7:401-12)。提出 Nodal 配位體與其輔因子 (例如 cripto) 相互作用以活化活化素之 I 型受體及 II 型受體，該等受體使 Smad2 磷酸化。Nodal 蛋白牽涉於對早期脊椎動物胚胎至關重要的許多事件中，包括中胚層形成、前軸模式化 (anterior patterning) 及左-右軸特異化。實驗證據已證實 Nodal 發訊活化 pAR3-Lux，一種先前已顯示特異性地對活化素及 TGF- β 起反應之螢光素酶報導體。然而，Nodal 不能誘導 pt1x2-Lux，一種特異性地對骨形態發生蛋白起反應之報導體。新近成果提供 Nodal 發訊係由活化素-TGF- β 路徑 Smad (Smad2 與 Smad3) 介導之直接生物化學證據。已有進一步證據顯示細胞外 cripto 蛋白為 Nodal 發訊所需，使之不同於活化素或 TGF- β 發訊。

生長與分化因子 8 (GDF8) 亦稱為肌肉抑制素。GDF8

為骨骼肌質量之負調節子。GDF8 在發育中之骨骼肌及成熟骨骼肌中高度表現。在轉殖基因小鼠中，GDF8 無效突變之特徵在於骨骼肌顯著肥大及增生 (McPherron 等人, *Nature*, 1997, 387:83-90)。骨骼肌質量的類似增加在牛中天然產生之 GDF8 突變中顯見 (Ashmore 等人, 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland 及 Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron 及 Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; 及 Kambadur 等人, *Genome Res.*, 1997, 7:910-915); 且在人類中較為突出 (Schuelke 等人, *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8)。研究已顯示人類中與 HIV 感染相關之肌肉消瘦 (muscle wasting) 伴隨 GDF8 蛋白表現增加 (Gonzalez-Cadavid 等人, *PNAS*, 1998, 95:14938-43)。此外，GDF8 可調節肌肉特異性酶 (例如肌酸激酶) 產生且調節肌母細胞增殖 (WO 00/43781)。GDF8 前肽可與成熟 GDF8 域二聚體非共價結合，從而使其生物活性鈍化 (Miyazono 等人 (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:6407-6415; Wakefield 等人 (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:7646-7654; 及 Brown 等人 (1990) *Growth Factors*, 3:35-43)。與 GDF8 或結構相關蛋白結合且抑制其生物活性之其他蛋白包括卵泡抑素，且可能包括卵泡抑素相關蛋白 (Gamer 等人 (1999) *Dev. Biol.*, 208:222-232)。

生長與分化因子 11 (GDF11) 亦稱為 BMP11，且為分泌蛋白 (McPherron 等人, 1999, *Nat. Genet.* 22:260-264)。在小鼠發育期間，GDF11 於尾芽、肢芽、上頷弓及下頷弓

以及背根神經節中表現 (Nakashima 等人, 1999, *Mech. Dev.* 80:185-189)。GDF11 在中胚層組織與神經組織模式化中起獨特作用 (Gamer 等人, 1999, *Dev Biol.*, 208:222-32)。已顯示 GDF11 為雞胚肢發育中軟骨生成及肌生成之負調節子 (Gamer 等人, 2001, *Dev Biol.* 229:407-20)。GDF11 在肌肉中之表現亦表明其以類似於 GDF8 之方式在調節肌肉生長方面起作用。此外, GDF11 在腦中之表現表明 GDF11 亦可具有與神經系統功能相關之活性。令人關注的是, 發現 GDF11 抑制嗅上皮之神經生成 (Wu 等人, 2003, *Neuron.* 37:197-207)。因此, GDF11 可在試管內及活體內應用於治療諸如肌肉疾病及神經退化性疾病 (例如肌萎縮性側索硬化) 之疾病。

骨形態發生蛋白 (BMP7) 亦稱為成骨蛋白 1 (OP-1), 且眾所周知其誘導軟骨及骨形成。此外, BMP7 調節一大批生理過程。舉例而言, BMP7 可為負責上皮骨生成現象之骨誘導因子。亦發現 BMP7 在鈣調節及骨內環境穩定方面起作用。如同活化素一般, BMP7 與 II 型受體 ActRIIA 及 ActRIIB 結合。然而, BMP7 及活化素將相異的 I 型受體募集至異聚受體複合物中。所觀測之主要 BMP7 I 型受體為 ALK2, 而活化素排他性地與 ALK4 (ActRIIB) 結合。BMP7 及活化素引發相異的生物學反應, 且活化不同的 Smad 路徑 (Macias-Silva 等人, 1998, *J Biol Chem.* 273:25628-36)。

如本文所證實, 作為變異體 ActRIIB 多肽 (ActRIIB) 之 GDF 阵多肽比野生型可溶性 ActRIIB 多肽更有效地增加

活體內紅血球水平，且在多種貧血模型中具有有益作用。應注意，紅血球生成為受多種因素調節之複雜過程，該等因素包括紅血球生成素、G-CSF 及鐵內環境穩定。術語「增加紅血球水平」及「促進紅血球形成」係指臨牀上可觀測之量度，諸如血容比、紅血球計數及血紅素量測值，且意欲不影響該等變化發生之機制。

除刺激紅血球水平以外，GDF 隣多肽亦適用於多種治療性應用，包括例如促進肌肉生長（參見 PCT 公開案第 WO 2006/012627 號及第 WO 2008/097541 號，該等公開案以全文引用的方式併入本文中）。在某些情況下，當出於增加肌肉之目的而投予 GDF 隣多肽時，可能需要減少對紅血球之影響或將對紅血球之影響降至最低。藉由監控正用 GDF 隣多肽治療之患者或作為用 GDF 隣多肽治療之候選者之患者的各種血液學參數，可基於個別患者之需要、基線血液學參數及治療目的來確定適當用藥（包括投藥量及投藥頻率）。此外，治療進程及隨時間對一或多個血液學參數的影響可適用於藉由增強患者護理，確定適當維持用藥（量與頻率）等來控制給予 GDF 隣多肽之患者。

本說明書中所用之術語在本發明之情形中及使用各術語之特定情形中一般具有其在此項技術中之普通含義。某些術語在本說明書之下文或其他處論述，以在描述本發明之組成物及方法以及如何製造及使用該等組成物方面向從業者提供額外指導。術語之任何使用範疇或含義在使用該術語之特定情形中將顯而易見。

「約 (about)」及「大致 (approximately)」一般應意謂在既定量測之性質或精確度的情況下所量測之量可接受的誤差度。典型地，例示性誤差度係在特定值或特定值範圍的 20% 以內，在 10% 以內較佳，且在 5% 以內更佳。

或者且尤其在生物系統中，術語「約」及「大致」可意謂與在特定值之數量級以內的值，在 5 倍以內較佳，且在 2 倍以內更佳。除非另加說明，否則本文所給之數量為近似值，其意謂當未明確規定時可推斷出術語「約」或「大致」。

本發明之方法可包括相互比較序列之步驟，包括野生型序列與一或多種突變體（序列變異體）相比較。該等比較典型地包含例如使用此項技術中所熟知之序列排比程式及/或演算法（例如 BLAST、FASTA 及 MEGALIGN，僅略舉一二）進行聚合物序列排比。熟習此項技術者可易於瞭解，在該等排比中（其中突變含有殘基插入或缺失），序列排比將在不含殘基插入或缺失之聚合物序列中引入「空隙 (gap)」（典型地以短劃線或「A」表示）。

所有文法形式及拼寫變化之「同源 (homologous)」係指兩種具有「共同演化起源」之蛋白質之間的關係，該等蛋白質包括來自相同種生物體之超家族的蛋白質以及來自不同種生物體之同源蛋白質。該等蛋白質（及其編碼核酸）具有如其序列相似性所反映之序列同源性，無論在一致性百分比方面抑或根據特定殘基或基元及保守位置的存在。

所有文法形式之術語「序列相似性 (sequence

similarity)」係指可能共享或可能不共享共同演化起源之核酸或胺基酸序列之間的一致性程度或對應程度。

然而，在常見用法及本申請案中，術語「同源」經諸如「高度」之副詞修飾時可指代序列相似性且可能與共同演化起源相關或無關。

2. GDF 隅多肽

在某些方面中，本發明係關於 GDF 隅多肽，例如可溶性變異體 ActRIIB 多肽，包括例如 ActRIIB 多肽之片段、功能變異體及經修飾形式。在某些具體實例中，GDF 隅多肽具有至少一種與相應野生型 ActRIIB 多肽相似或相同的生物活性。舉例而言，本發明之 GDF 隅多肽可與 ActRIIB 配位體（例如活化素 A、活化素 AB、活化素 B、Nodal、GDF8、GDF11 或 BMP7）結合並抑制其功能。視情況，GDF 隅多肽增加紅血球水平。GDF 隅多肽之實例包括具有一或多個序列變異之人類 ActRIIB 前驅多肽（SEQ ID NO: 1 或 39）及具有一或多個序列變異之可溶性人類 ActRIIB 多肽（例如 SEQ ID NO: 22、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 及 41）。GDF 隅係指相對於其他 ActRIIB 配位體（包括例如 GDF11 及 / 或肌肉抑制素）對活化素之親和力較低的 ActRIIB 多肽。

如本文所用之術語「ActRIIB」係指來自任何物種之活化素 IIb 型受體（ActRIIB）蛋白家族及藉由突變誘發或其他修飾而來源於該等 ActRIIB 蛋白之變異體。本文中提及 ActRIIB 應理解為提及當前所鑑別之任一形式。ActRIIB 家

族成員一般為跨膜蛋白，其由具有半胱胺酸富含區之配位體結合胞外域、跨膜域及具有預測絲胺酸/蘇胺酸激酶活性之細胞質域構成。圖 1 中說明人類 ActRIIA 可溶性胞外域（供比較）與 ActRIIB 可溶性胞外域之胺基酸序列。

術語「ActRIIB 多肽（ActRIIB polypeptide）」包括包含 ActRIIB 家族成員之任何天然產生之多肽以及其保留有用活性之任何變異體（包括突變體、片段、融合物及擬肽形式）的多肽。參見，例如 WO 2006/012627。舉例而言，ActRIIB 多肽包括來源於任何已知 ActRIIB 之序列的多肽，該已知 ActRIIB 之序列與 ActRIIB 多肽之序列至少約 80%一致且視情況至少 85%、90%、95%、97%、99%或超過 99%一致。舉例而言，ActRIIB 多肽可與 ActRIIB 蛋白及/或活化素結合並抑制其功能。可針對活體內促進紅血球形成之活性來選擇作為 GDF 隣之 ActRIIB 多肽。ActRIIB 多肽之實例包括人類 ActRIIB 前驅多肽（SEQ ID NO: 1 及 39）及可溶性人類 ActRIIB 多肽（例如 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 及 41）。除非另外特定指明，否則本文所述之所有 ActRIIB 相關多肽的胺基酸編號係基於 SEQ ID NO: 1 之編號。

人類 ActRIIB 前驅蛋白序列如下：

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNAN
WELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV
KKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNE
RFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLTVALYSLLPIGGLSLI

VLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLL
 EIKARGRGCVWKAQLMNDVAVKIFPLQDKQSWQSEREI
 FSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLT
 DYLKGNIIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHK
 PSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA VRFEPGKPPGDT
 HGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLW
 ELVSRCKAADGPVDEYMLPFEETIGQHPSLEELQEVVVHK
 KMRPTIKDHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCV
 EERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ
 ID NO: 1)。

信號肽加單底線，胞外域呈粗體，且潛在 N 連接糖基化位點處於方框中。

文獻中亦報導在位置 64 具有丙胺酸之形式，如下：

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNAN**
 WELERT**N**QSGLERCEGEQDKRLHCYASWA**N**SSGTIELV
 KKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNE
 RFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLTVLAYSLLPIGGLSLI
 VLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLL
 EIKARGRGCVWKAQLMNDVAVKIFPLQDKQSWQSEREI
 FSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLT
 DYLKGNIIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHK
 PSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA VRFEPGKPPGDT
 HGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLW
 ELVSRCKAADGPVDEYMLPFEETIGQHPSLEELQEVVVHK

KMRPTIKDHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCV
EERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ
ID NO: 39) 。

人類 ActRIIB 可溶性(細胞外)經處理多肽之序列如下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKR
LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT
(SEQ ID NO: 2) 。

具有 A64 之替代形式如下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKR
LHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT
(SEQ ID NO: 40) 。

在一些條件下，可產生在 N 末端具有「 SGR... 」序列之蛋白質。胞外域之 C 末端「尾」加底線。「尾」缺失之序列 (Δ15 序列) 如下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKR
LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3) 。

具有 A64 之替代形式如下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKR
LHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 41) 。

在一些條件下，可產生在 N 末端具有「 SGR... 」序列之

蛋白質。編碼人類 ActRIIB 前驅蛋白之核酸序列如下（基因庫登錄號（Genbank entry）NM_001106 之核苷酸 5-1543）（所示序列在位置 64 提供丙胺酸，且可經修飾以替代地提供精胺酸）：

```

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGG
GGATCGCTGTGGCCC GGCTCTGGCGTGGGGAGGCTGAG
ACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTG
GAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG
CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGC
CAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTG
CTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGT
GTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGC
TGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGC
CAGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCC
CGACAGCCCCCACCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCAC
TGCTGCCCATGGGGCCTTCCCTACGTCCCTGCTGGC
CTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTACGGTCAT
GTGGACATCCATGAGGACCCCTGGCCTCCACCAACCACCC
CTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCA
AGGCTCGGGGCGCTTGGCTGTCTGGAAGGCCAGC
TCATGAATGACTTGTAGCTGTCAAGATCTCCCACCTCCA
GGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCTCAG
CACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTACAGTTCAT
TGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCT

```

GTGGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACG
 GATTACCTCAAGGGGAACATCATTACATCACATGGAACGAACTG
 TGTCATGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGCCTCTCATACC
 TGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCTGGCGAGGGCCACA
 AGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTT
 TGGCTTGGCTGTTGATTGAGCCAGGGAAACCTCCAGG
 GGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGC
 TCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTCCAGAGAGA
 TGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGTG
 CTGTGGGAGCTTGTCTCGCTGCAAGGGCTGCAGACGGA
 CCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGAGATTG
 GCCAGCACCCCTCGTTGGAGGGAGCTGCAGGAGGTGGTGG
 TGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAAGATCACTGGT
 TGAAACACCCGGGCCTGGCCAGCTTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCG
 CGGGCTGTGGAGGAGCAGGGTGTCCCTGATTGGAGGT
 CGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTCCCTGGT
 GACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCTAAAGAGTC
 AAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4) 。

編碼人類 ActRIIA 可溶性 (細胞外) 多肽之核酸序列
 如下 (所示序列在位置 64 提供丙胺酸，且可經修飾以替代
 地提供精胺酸)：

GGCGTGGGGAGGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTAC

TACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGC
 GGCCTGGAGCGCTCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCT
 GCACTGCTACGCCTCCTGGCCAACAGCTCTGGCACCAT
 CGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAA
 CTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAA
 CCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGC
 AACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTGGGGCCCG
 GAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCACC
 (SEQ ID NO: 5)。

在一特定具體實例中，本發明係關於作為變異體形式之可溶性 ActRIIB 多肽的 GDF 駛多肽。如本文所述之術語「可溶性 ActRIIB 多肽 (soluble ActRIIB polypeptide)」一般係指包含 ActRIIB 蛋白之胞外域的多肽。如本文所用之術語「可溶性 ActRIIB 多肽」包括 ActRIIB 蛋白之任何天然產生之胞外域以及其保留有用活性之任何變異體 (包括突變體、片段及擬肽形式)。舉例而言，ActRIIB 蛋白之胞外域與配位體結合且一般可溶。可溶性 ActRIIB 多肽之實例包括 ActRIIB 可溶性多肽 (例如 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 及 41)。除包含 ActRIIB 蛋白之胞外域以外，可溶性 ActRIIB 多肽之其他實例亦包含信號序列，參見實例 1。信號序列可為 ActRIIB 之原生信號序列，或來自另一蛋白之信號序列，諸如組織纖維蛋白溶酶原活化子 (TPA) 信號序列或蜜蜂毒素 (HBM) 信號序列。

本發明鑑別 ActRIIB 之功能活性部分及變異體。申請者

已確定具有 Hilden 等人 (Blood. 1994 年 4 月 15 日, 83(8):2163-70) 所揭示之序列且在對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 64 之位置處具有丙胺酸 (A64) 的 Fc 融合蛋白對活化素及 GDF-11 具有相對低的親和力。相比之下，在位置 64 具有精胺酸 (R64) 之相同 Fc 融合蛋白對活化素及 GDF-11 之親和性處於低奈莫耳 (nanomolar) 至高皮莫耳 (picomolar) 範圍內。因此，具有 R64 之序列在本發明中用作人類 ActRIIB 之野生型參考序列。

Attisano 等人 (Cell. 1992 年 1 月 10 日, 68(1):97-108) 說明在 ActRIIB 之胞外域的 C 末端處脯胺酸結 (proline knot) 缺失使受體對活化素之親和力降低。相對於包括脯胺酸結區域及完整近膜域 (juxtamembrane domain) 之 ActRIIB(20-134)-Fc，含有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 20 至 119 的 ActRIIB-Fc 融合蛋白「ActRIIB(20-119)-Fc」與 GDF-11 及活化素之結合較低。然而，即使脯胺酸結區域斷裂，ActRIIB(20-129)-Fc 蛋白相對於野生型仍保留類似但稍低之活性。因而，預期在胺基酸 134、133、132、131、130 及 129 處終止之 ActRIIB 胞外域皆具活性，而在 134 或 133 處終止之構築體可能最具活性。類似地，預期在殘基 129 至 134 中之任一者處的突變並不大幅度地改變配位體結合親和力。其支持依據是，P129 及 P130 之突變實質上不降低配位體結合性。因此，作為 ActRIIB-Fc 融合蛋白之 GDF 阈多肽可能早在胺基酸 109 (最終半胱胺酸) 處即終止，然而，預期在 109 及 119 處終止或在 109 與 119 之間終止的形式具

有較低配位體結合性。胺基酸 119 保守性較差且因而易改變或截斷。在 128 處或 128 之後終止之形式保留配位體結合活性。在 119 及 127 處終止或在 119 與 127 之間終止的形式將具有中間結合能力。視臨床環境或實驗環境而定，可能需要使用此等形式中之任一者。

在 ActRIIB 之 N 末端處，預期在胺基酸 29 或 29 之前起始之蛋白質將保留配位體結合活性。胺基酸 29 表示初始半胱胺酸。位置 24 丙胺酸突變成天門冬醯胺會引入 N 連接糖基化序列而實質上不影響配位體結合性。此證實充分容許在信號分裂肽與半胱胺酸交聯區之間的對應於胺基酸 20-29 之區域中的突變。詳言之，在位置 20、位置 21、位置 22、位置 23 及位置 24 起始之構築體將保留活性，且預期在位置 25、位置 26、位置 27、位置 28 及位置 29 起始之構築體亦保留活性。令人驚訝的是，實施例中所示之數據說明在位置 22、位置 23、位置 24 或位置 25 起始之構築體將最具活性。

綜合考量，ActRIIB 之活性部分包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109，且 GDF 鮮構築體可例如包含在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 20-29 的殘基起始且在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 109-134 之位置終止的一部分 ActRIIB。其他實例包括在 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 20-29 或位置 21-29 起始且在 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 119-134、位置 119-133、位置 129-134 或位置 129-133 終止的構築體。其他實例包括在 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 20-24

(或位置 21-24 或位置 22-25) 起始且在 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 109-134 (或位置 109-133)、位置 119-134 (或位置 119-133) 或位置 129-134 (或位置 129-133) 終止的構築體。本發明亦涵蓋處於此等範圍內之變異體，尤其與 SEQ ID NO: 1 或 39 之相應部分具有至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 一致性的變異體。在某些具體實例中，GDF 隅多肽包含以下多肽，基本上由以下多肽所組成，或由以下多肽所組成：具有與 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸殘基 25-131 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致之胺基酸序列的多肽。在某些具體實例中，GDF 隅多肽包含以下多肽，基本上由以下多肽所組成，或由以下多肽所組成：具有與 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致之胺基酸序列的多肽。在較佳具體實例中，GDF 隅多肽由 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列所組成，或基本上由 SEQ ID NO: 7、26、28、29、32、37 或 38 之胺基酸序列所組成。

本發明包括複合 ActRIIB 結構之分析結果，如圖 1 所示，其證實配位體結合隅係由殘基 Y31、N33、N35、L38 至 T41、E47、E50、Q53 至 K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78 至 N83、Y85、R87、A92 及 E94 至 F101 界定。在此等位置處，預期將容許保守性突變，但充分容許 K74A 突變，亦充分容許 R40A、K55A、F82A 及位置 L79 之突變。R40 在爪蟾 (Xenopus) 中為 K，表明在此位置處將容許鹼

性胺基酸。Q53 在牛 ActRIIB 中為 R 且在爪蟾 ActRIIB 中為 K，且因而在此位置處將容許包括 R、K、Q、N 及 H 之胺基酸。因此，GDF 阵蛋白之通式包含 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 29-109，但視情況在 20-24 或 22-25 範圍內之位置起始且在 129-134 範圍內之位置終止，且在配位體結合陣中包含不超過 1、2、5、10 或 15 個保守性胺基酸變化且在配位體結合陣之位置 40、位置 53、位置 55、位置 74、位置 79 及 / 或位置 82 包含零個、一個或超過一個非保守性變化。此類蛋白可能與 SEQ ID NO: 1 或 39 之胺基酸 29-109 之序列保持超過 80%、90%、95% 或 99% 的序列一致性。可尤其充分容許變異的結合袋外部之位點包括胞外域之胺基末端及羧基末端（如上文所指出）以及位置 42-46 及位置 65-73。在位置 65 天門冬醯胺變化成丙胺酸（N65A）實際上改善 A64 背景中之配位體結合性，且因而預期對 R64 背景中之配位體結合性無不利影響。此變化可能消除 A64 背景中 N65 處之糖基化，由此證實此區域中可能容許顯著變化。雖然不太容許 R64A 變化，但充分容許 R64K，且因而在位置 64 可容許另一鹼性殘基如 H。

ActRIIB 在幾乎所有脊椎動物中充分保守，且胞外域之較大區段完全保守。與 ActRIIB 結合之許多配位體亦高度保守。因此，比較來自各種脊椎動物生物體之 ActRIIB 序列得以瞭解可改變之殘基。因此，適合用作 GDF 阵之活性人類 ActRIIB 變異體多肽可在相應位置處包括一或多個來自另一脊椎動物 ActRIIB 之序列的胺基酸，或可包括與人類或其

他脊椎動物序列中之殘基類似的殘基。以下實例說明此種定義活性 ActRIIB 變異體之方法。L46 在爪蟾 ActRIIB 中為纈氨酸，且因而此位置可改變，且視情況可變成另一疏水性殘基（諸如 V、I 或 F）或非極性殘基（諸如 A）。E52 在爪蟾中為 K，表明此位點可容許多種變化，包括極性殘基，諸如 E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y 及可能之 A。T93 在爪蟾中為 K，表明在此位置處容許廣泛結構變化，以極性殘基為佳，諸如 S、K、R、E、D、H、G、P、G 及 Y。F108 在爪蟾中為 Y，且因而應容許 Y 或其他疏水性基團，諸如 I、V 或 L。E111 在爪蟾中為 K，表明在此位置處將容許帶電殘基，包括 D、R、K 及 H 以及 Q 及 N。R112 在爪蟾中為 K，表明在此位置處容許鹼性殘基，包括 R 及 H。位置 119 之 A 相對不太保守，且在齧齒動物中呈現為 P 並在爪蟾中呈現為 V，因而在此位置處應基本上容許任何胺基酸。

本發明說明添加另一 N 連接糖基化位點 (N-X-S/T) 使 ActRIIB-Fc 融合蛋白之血清半生期相對於 ActRIIB(R64)-Fc 形式增加。藉由在位置 24 引入天門冬醯胺 (A24N 構築體)，產生賦予較長半生期之 NXT 序列。在 42-44(NQS) 及 65-67 (NSS) 處發現其他 NX(T/S) 序列，但後者在位置 64 無法以 R 有效地糖基化。在圖 1 所定義之配位體結合阱外部的位置處一般可引入 N-X-S/T 序列。尤其適於引入非內源性 N-X-S/T 序列之位點包括胺基酸 20-29、20-24、22-25、109-134、120-134 或 129-134。N-X-S/T 序列亦可引入 ActRIIB 序列與 Fc 或其他融合組件之間的連接子中。可藉

由於在關於預先存在之 S 或 T 正確的位置處引入 N 或藉由在對應於預先存在之 N 的位置處引入 S 或 T，在最小努力下引入此類位點。因此，將產生 N 連接糖基化位點之理想變化為：A24N、R64N、S67N(可能與 N65A 變化組合)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S 及 R112T。預測有待糖基化之任何 S 皆可變成 T 而不產生免疫原性位點，因為糖基化提供保護。同樣地，預測有待糖基化之任何 T 皆可變成 S。因此，本發明涵蓋 S67T 及 S44T 變化。同樣地，在 A24N 變異體中，可使用 S26T 變化。因此，GDF 駒可為具有一或多個其他非內源性 N 連接糖基化一致序列的 ActRIIB 變異體。

ActRIIB 之位置 L79 可經改變以賦予改變之活化素-肌肉抑制素 (GDF-11) 結合性質。L79A 或 L79P 使 GDF-11 結合性與活化素結合性相比降低的程度更大。L79E 或 L79D 保留 GDF-11 結合性。顯然，L79E 及 L79D 變異體已大幅降低活化素結合性。活體內實驗表明此等非活化素受體保留增加紅血球之顯著能力，但顯示對其他組織之影響減少。此等資料說明獲得對活化素影響較低之多肽的可取性及可行性。在例示性具體實例中，本文所述之方法利用 GDF 駒多肽，該 GDF 駒多肽為變異體 ActRIIB 多肽，其在對應於 SEQ ID NO: 1 或 39 之位置 79 處包含酸性胺基酸 (例如 D 或 E)，且視情況與一或多個其他胺基酸取代、添加或缺失組合。

所述變異可以多種方式組合。此外，本文所述之突變

誘發程式的結果表明在 ActRIIB 中存在通常有益於保守之胺基酸位置。此等胺基酸位置包括位置 64 (鹼性胺基酸)、位置 80 (酸性或疏水性胺基酸)、位置 78 (疏水性胺基酸，且尤其色胺酸)、位置 37 (酸性胺基酸，且尤其天門冬胺酸或麩胺酸)、位置 56 (鹼性胺基酸)、位置 60 (疏水性胺基酸，尤其苯丙胺酸或酪胺酸)。因此，在本文所揭示之各變異體中，本發明提供可保守之胺基酸構架。可能需要保守之其他位置如下：位置 52 (酸性胺基酸)、位置 55 (鹼性胺基酸)、位置 81 (酸性胺基酸)、位置 98 (極性或帶電胺基酸，尤其 E、D、R 或 K)。

在某些具體實例中，可藉由篩選由編碼 ActRIIB 多肽 (例如 SEQ ID NO: 4 及 5) 之核酸的相應片段重組產生之多肽來獲得 ActRIIB 多肽之經分離片段。此外，可使用此項技術中已知之技術，諸如習知 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化學法來化學合成片段。可產生片段 (重組或藉由化學合成) 且對其進行測試以鑑別可起到 (例如) ActRIIB 蛋白或 ActRIIB 配位體之拮抗劑 (抑制劑) 或促效劑 (活化劑) 之功能的彼等肽基片段。

在某些具體實例中，GDF 隊多肽為變異體 ActRIIB 多肽，其具有與選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 或 41 之胺基酸序列至少 75%一致的胺基酸序列。在某些狀況下，GDF 隊具有與選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 或 41 之胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 一

致的胺基酸序列。在某些具體實例中，GDF 阵包含以下胺基酸序列，基本上由以下胺基酸序列所組成，或由以下胺基酸序列所組成：與選自 SEQ ID NO: 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 或 41 之胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或 100%一致的胺基酸序列，其中對應於 SEQ ID NO: 1 之 L79 的位置為酸性胺基酸（例如 D 或 E 胺基酸殘基）。

在某些具體實例中，本發明預期藉由修飾 GDF 阵多肽之結構來製造功能變異體以達成諸如增強治療功效或穩定性（例如，活體外儲存壽命及活體內抗蛋白降解性）之目的。GDF 阵多肽亦可藉由胺基酸取代、缺失或添加而產生。舉例而言，可合理預期以異白胺酸或纈胺酸單獨置換白胺酸、以麩胺酸單獨置換天門冬胺酸、以絲胺酸單獨置換蘇胺酸或以結構相關胺基酸類似地置換胺基酸（例如保守性突變）將對所得分子之生物活性無較大影響。保守性置換發生在胺基酸家族內，其與側鏈相關。藉由評估 GDF 阵多肽相對於未經修飾之 GDF 阵多肽或野生型 ActRIIB 多肽在細胞中產生反應的能力或與未經修飾之 GDF 阵多肽或野生型 ActRIIB 多肽相比與一或多種配位體（諸如活化素、GDF-11 或肌肉抑制素）結合的能力，可易於確定在 GDF 阵多肽之胺基酸序列中的變化是否產生功能變異體。

在某些特定具體實例中，本發明預期在 ActRIIB 多肽之胞外域（亦稱為配位體結合域）中製造突變，以使 ActRIIB 多肽具有改變之配位體結合活性（例如結合親和力或結合

特異性)。在某些狀況下，該等 GDF 阵多肽對特異性配位體之結合親和力改變(提高或降低)。在其他狀況下，GDF 阵多肽對 ActRIIB 配位體之結合特異性改變。

舉例而言，本發明提供相對於活化素優先結合 GDF8/GDF11 之 GDF 阵多肽。本發明進一步確立該等多肽降低脫靶效應的可取性，而對於嚴重疾病之治療可能不太需要該等選擇性變異體，在嚴重疾病之治療中為獲得治療效果，可能需要紅血球水平極大增加，且可接受一定程度的脫靶效應。舉例而言，ActRIIB 蛋白之胺基酸殘基，諸如 E39、K55、Y60、K74、W78、D80 及 F101 係在配位體結合陣中且介導與其配位體(諸如活化素及 GDF8)結合。因此，本發明提供一種 GDF 陣，其包含 ActRIIB 受體之經改變之配位體結合域(例如 GDF8 結合域)，且在彼等胺基酸殘基處包含一或多個突變。相對於 ActRIIB 受體之野生型配位體結合域，經改變之配位體結合域視情況可對諸如 GDF8 之配位體的選擇性增加。為說明起見，此等突變使經改變之配位體結合域對 GDF8 之選擇性增加超過對活化素之選擇性。視情況，經改變之配位體結合域的活化素結合之 K_d 與 GDF8 結合之 K_d 的比率為野生型配位體結合域之比率的至少 2 倍、5 倍、10 倍或甚至 100 倍。視情況，經改變之配位體結合域的抑制活化素之 IC_{50} 與抑制 GDF8 之 IC_{50} 的比率為野生型配位體結合域之比率的至少 2 倍、5 倍、10 倍或甚至 100 倍。視情況，經改變之配位體結合域以至少為抑制活化素之 IC_{50} 的二分之一、五分之一、十分之一或甚

至百分之一的 IC_{50} 抑制 GDF8。

作為一特定實例，ActRIIB 之配位體結合域的帶正電胺基酸殘基 Asp (D80) 可突變成不同胺基酸殘基，以產生優先結合 GDF8 而非活化素的 GDF 阵多肽。D80 殘基較佳變成選自由以下者所組成之群組的胺基酸殘基：不帶電胺基酸殘基、帶負電胺基酸殘基及疏水性胺基酸殘基。作為另一特定實例，疏水性殘基 L79 可變成酸性胺基酸-天門冬胺酸或麩胺酸，以大幅降低活化素結合性，同時保持 GDF11 結合性。如熟習此項技術者應瞭解，大部分所述突變、變異或修飾可在核酸水平上進行，或在一些狀況下，藉由轉譯後修飾或化學合成來進行。該等技術在此項技術中已為熟知。

在某些具體實例中，本發明涵蓋在 ActRIIB 中具有特定突變以改變 ActRIIB 多肽之糖基化的 GDF 阵多肽。圖 1 中說明 GDF 阵多肽中之例示性糖基化位點（例如，加底線之 NX(S/T) 位點）。可選擇該等突變以引入或消除一或多個糖基化位點，諸如 O-連接或 N 連接糖基化位點。天門冬醯胺連接之糖基化識別位點一般包含三肽序列，亦即，天門冬醯胺-X-蘇胺酸（其中「X」為任何胺基酸），該三肽序列可由適當細胞糖基化酶特異性地識別。亦可藉由向野生型 ActRIIB 多肽之序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基，或以一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代野生型 ActRIIB 多肽之序列（對於 O-連接糖基化位點）來進行改變。在糖基化識別位點之第一或第三胺基酸位置中之一或兩者處多

種胺基酸取代或缺失（及/或在第二位置處胺基酸缺失）在經修飾之三肽序列上引起非糖基化。增加 GDF 駢多肽上之碳水化合物部分之數目的另一方法係藉由糖苷與 GDF 駢多肽之化學偶合或酶促偶合。視所用偶合模式而定，糖可與以下連接：(a) 精胺酸及組胺酸；(b) 自由羧基；(c) 自由硫氫基，諸如半胱胺酸之硫氫基；(d) 自由羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥脯胺酸之羥基；(e) 芳族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之芳族殘基；或 (f) 麥醯胺酸之醯胺基。此等方法描述於 WO 87/05330 以及 Aplin 及 Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 第 259-306 頁中，該等文獻以引用的方式併入本文中。移除 GDF 駢多肽上所存在之一或多個碳水化合物部分可以化學法或酶促法實現。化學去糖基化可涉及例如使 GDF 駢多肽與化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物接觸。此處理使得除連接性糖 (N-乙醯葡萄糖胺或 N-乙醯半乳糖胺) 以外的大部分糖或所有糖裂解，同時留下完整胺基酸序列。Hakimuddin 等人 (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 及 Edge 等人 (1981) Anal. Biochem. 118:131 進一步描述化學去糖基化。GDF 駢多肽上之碳水化合物部分的酶促裂解可藉由使用多種內切糖苷酶及外切糖苷酶來達成，如 Thotakura 等人 (1987) Meth. Enzymol. 138:350 所述。視所用表現系統之類型而定，適當時可調整 GDF 駢多肽之序列，如哺乳動物、酵母、昆蟲及植物細胞皆可引入可受該肽之胺基酸序列影響的不同糖基化模式。一般而言，用於人類之 GDF 駢多肽將在提供適當

糖基化之哺乳動物細胞系，諸如 HEK293 或 CHO 細胞系中表現，然而，預期其他哺乳動物表現細胞系同樣適用。

本發明進一步涵蓋一種產生變異體，尤其 GDF 阵多肽之組合變異體組（視情況包括截斷變異體）之方法；組合突變體庫尤其適用於鑑別 GDF 阵序列。舉例而言，篩選該等組合文庫之目的可為產生具有改變之性質，諸如改變之藥物動力學或改變之配位體結合性的 GDF 阵多肽變異體。下文提供多種篩選檢定，且該等檢定可用於評估變異體。舉例而言，可針對與 ActRIIB 多肽結合之能力、防止 ActRIIB 配位體與 ActRIIB 多肽結合之能力或干擾 ActRIIB 配位體所引起之發訊的能力來篩選 GDF 阵多肽變異體。

亦可在基於細胞之檢定或活體內檢定中測試 GDF 阵多肽或其變異體之活性。舉例而言，可評估 GDF 阵多肽變異體對紅血球生成中所涉及之基因表現的影響。需要時，此可在一或多種重組 ActRIIB 配位體蛋白（例如活化素）存在下進行，且細胞可經轉染以產生 GDF 阵多肽及/或其變異體且視情況產生 ActRIIB 配位體。同樣地，可將 GDF 阵多肽投予小鼠或其他動物，且可使用經技術公認之方法評估一或多個血液量度，諸如 RBC 計數、血紅素水平、血容比水平、鐵儲量或網狀紅血球計數。

可產生源自組合之變異體，其相對於參考 GDF 阵多肽具有選擇性效能。當該等變異體蛋白自重組 DNA 構築體中表現時，其可用於基因治療方案。同樣地，突變誘發可產生具有顯著不同於相應未經修飾之 GDF 阵多肽之細胞內半

域之融合蛋白)、糖基化位點修飾(包括例如向 GDF 隊多肽中添加糖基化位點)及碳水化合物部分修飾(包括例如自 GDF 隊多肽移除碳水化合物部分)。在融合蛋白之狀況下，GDF 隊多肽與諸如 IgG 分子之穩定子域(例如 Fc 域)融合。如本文所用之術語「穩定子域(stabilizer domain)」不僅係指在融合蛋白狀況下之融合域(例如 Fc)，而且包括非蛋白質性修飾(諸如碳水化合物部分)或非蛋白性聚合物(諸如聚乙二醇)。

在某些具體實例中，本發明製造可利用的經分離及/或經純化形式之 GDF 隊多肽，其係自其他蛋白質分離或以其他方式實質上不含其他蛋白質。

在某些具體實例中，本發明之 GDF 隊多肽(未經修飾或經修飾)可由此項技術中已知之多種技術產生。舉例而言，該等 GDF 隊多肽可使用標準蛋白質化學技術合成，諸如 Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) 及 Grant G. A. (編), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992) 中所述之技術。此外，自動化肽合成器可購得(例如 Advanced ChemTech 396 型； Milligen/Bioscience 9600)。或者，GDF 隊多肽、其片段或變異體可使用此項技術中所熟知之各種表現系統(例如大腸桿菌(*E. coli*)、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、COS 細胞、桿狀病毒(baculovirus))來重組產生。在另一具體實例中，經修飾或未經修飾之 GDF 隊多肽可藉由使用例如蛋白酶(例如胰蛋白酶、嗜熱菌蛋白

白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶或配對鹼性胺基酸轉化酶 (PACE)) 來消化重組產生之全長 GDF 隅多肽而產生。電腦分析 (使用市售軟體，例如 MacVector、Omega、PCGene，Molecular Simulation 公司) 可用於鑑別蛋白水解分裂位點。或者，該等 GDF 隅多肽可由諸如此項技術中已知之標準技術，諸如藉由化學裂解 (例如溴化氰、羥胺) 自重組產生之全長 GDF 隅多肽產生。

3. 編碼 GDF 隅多肽之核酸

在某些方面中，本發明提供編碼本文所揭示之任一 GDF 隅多肽的經分離及/或重組核酸。SEQ ID NO: 4 編碼天然產生之 ActRIIB 前驅多肽，而 SEQ ID NO: 5 編碼可溶性 ActRIIB 多肽，且 SEQ ID NO: 25、27、30 及 31 編碼可溶性 GDF 隅。本發明核酸可為單鏈或雙鏈。該等核酸可為 DNA 或 RNA 分子。舉例而言，此等核酸可用於製造 GDF 隅多肽之方法或用作直接治療劑 (例如在基因治療中)。

在某些方面中，編碼 GDF 隅多肽之本發明核酸應進一步理解為包括作為 SEQ ID NO: 5、25、27、30 及 31 之變異體的核酸。變異體核苷酸序列包括不同之處在於一或多個核苷酸取代、添加或缺失的序列，諸如等位基因變異體；且因此，其將包括與 SEQ ID NO: 5、25、27、30 及 31 中所指定之編碼序列之核苷酸序列不同的編碼序列。

在某些具體實例中，本發明提供與 SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31 至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100%一致的經分離或重組核酸序列。一般熟習此項技術

者應瞭解，與 SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31 互補之核酸序列及 SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31 之變異體亦處於本發明範疇內。在其他具體實例中，本發明之核酸序列可為經分離序列、重組序列及/或與異源核苷酸序列融合之序列，或在 DNA 文庫中之序列。

在其他具體實例中，本發明之核酸亦包括：在高度嚴格條件下與 SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31 中所指定之核苷酸序列雜交的核苷酸序列；SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31 之互補序列；或其片段。如上文所論述，一般熟習此項技術者應易於瞭解，可改變促進 DNA 雜交之適當嚴格度條件。舉例而言，可在約 45°C 下於 6.0×氯化鈉/檸檬酸鈉 (SSC) 中進行雜交，接著在 50°C 下以 2.0×SSC 洗滌。舉例而言，在洗滌步驟中可自 50°C 下約 2.0×SSC 之低嚴格度至 50°C 下約 0.2×SSC 之高嚴格度來選擇鹽濃度。此外，在洗滌步驟中，溫度可自室溫 (約 22°C) 之低嚴格度條件增至約 65°C 之高嚴格度條件。溫度與鹽均可變化，或可保持溫度或鹽濃度中之一者恆定，同時改變另一變數。在一具體實例中，本發明提供在室溫下於 6×SSC 中之低嚴格度條件下雜交，接著在室溫下以 2×SSC 洗滌之核酸。

因遺傳密碼簡并而不同於 SEQ ID NO: 5、25、27、30 或 31 所示之核酸的經分離核酸亦處於本發明範疇內。舉例而言，許多胺基酸係由超過一個三聯體確定。確定相同胺基酸之密碼子或同義語（例如，CAU 及 CAC 為組胺酸之同義語）可產生不影響蛋白質之胺基酸序列的「靜默」突變。

在某些具體實例中，GDF 隊多肽將由替代性核苷酸序列編碼。替代性核苷酸序列關於原生 GDF 隊核酸序列為簡并的，但仍編碼相同融合蛋白。在某些具體實例中，具有 SEQ ID NO: 26 之 GDF 隊係由包含 SEQ ID NO: 30 之替代性核酸序列編碼。然而，預期在哺乳動物細胞中會存在引起本發明蛋白質之胺基酸序列變化的 DNA 序列多形現象。熟習此項技術者應瞭解，由於天然等位基因變異，因此在編碼特定蛋白質之核酸的一或多個核苷酸（至多為核苷酸之約 3%-5%）中之此等變異可存在於特定物種之個體中。任何及所有該等核苷酸變異及所得胺基酸多形現象處於本發明範疇內。

在某些具體實例中，本發明之重組核酸可與表現構築體中之一或多個調節核苷酸序列可操作性地連接。調節核苷酸序列一般將適於供表現用之宿主細胞。此項技術中已知用於多種宿主細胞的眾多類型之適當表現載體及適宜調節序列。典型地，該一或多種調節核苷酸序列可包括（但不限於）啟動子序列、前導序列或信號序列、核糖體結合位點、轉錄起始及終止序列、轉譯起始及終止序列及強化子或活化子序列。本發明涵蓋此項技術中已知之組成性或誘導性啟動子。啟動子可為天然產生之啟動子或組合超過一個啟動子元件之雜交啟動子。表現構築體可存在於細胞中之離合染色小體（諸如質體）上，或表現構築體可插入染色體中。在一較佳具體實例中，表現載體含有可選擇標記基因，以允許選擇經轉型之宿主細胞。可選擇標記基因

在此項技術中已為熟知且將隨所用宿主細胞而變。

在本發明之某些方面中，本發明核酸係提供於包含編碼 GDF 隈多肽且與至少一個調節序列可操作性地連接之核昔酸序列的表現載體中。調節序列經技術公認且經選擇以引導 GDF 隈多肽表現。因此，術語調節序列包括啟動子、強化子及其他表現控制元件。例示性調節序列描述於 Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中。舉例而言，控制與之可操作性地連接之 DNA 序列之表現的多種表現控制序列中之任一者可用於此等載體中以表現編碼 GDF 隈多肽之 DNA 序列。該等適用之表現控制序列包括例如 SV40 之早期啟動子及晚期啟動子、tet 啟動子、腺病毒或細胞巨大病毒之即刻早期啟動子、RSV 啟動子、lac 系統、trp 系統、TAC 或 TRC 系統、T7 啟動子(其表現係由 T7 RNA 聚合酶引導)、入噬菌體之主要操縱子及啟動子區、fd 外殼蛋白之控制區、3-磷酸甘油酸激酶或其他醣解酶之啟動子、酸性磷酸酶啟動子(例如 Pho5)、酵母 α 交配因子之啟動子、桿狀病毒系統之多面體啟動子及已知控制原核或真核細胞或其病毒之基因表現的其他序列，及其各種組合。應瞭解，表現載體之設計可取決於以下因素：諸如待轉型之宿主細胞的選擇及/或所要表現之蛋白質類型。此外，亦應考慮載體之複本數、控制複本數之能力及載體所編碼之任何其他蛋白質(諸如抗生素標記)的表現。

可藉由將經選殖基因或其部分接合至適於原核細胞、

真核細胞（酵母、鳥類、昆蟲或哺乳動物）或兩者中之表現的載體中來產生本發明之重組核酸。產生重組 GDF 隣多肽之表現運載體包括質體及其他載體。舉例而言，適宜之載體包括用於原核細胞（諸如大腸桿菌）中之表現的以下類型質體：源自 pBR322 之質體、源自 pEMBL 之質體、源自 pEX 之質體、源自 pBTac 之質體及源自 pUC 之質體。

一些哺乳動物表現載體含有有利於載體在細菌中增殖之原核序列與一或多個在真核細胞中表現之真核轉錄單元。源自 pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、psvt7、pko-neo 及 pHyg 之載體為適於真核細胞轉染之哺乳動物表現載體的實例。一些此等載體係以來自細菌質體（諸如 pBR322）之序列修飾，以有利於原核細胞與真核細胞中之複製及耐藥性選擇。或者，諸如牛乳突狀瘤病毒（BPV-1）或艾普斯坦-巴爾病毒（Epstein-Barr virus）（pHEBo、源自 pREP 之病毒及 p205）之病毒衍生物可用於在真核細胞中短暫表現蛋白質。其他病毒（包括反轉錄病毒）表現系統之實例可見於下文基因治療遞送系統之描述中。用於質體製備及宿主生物體轉型之各種方法在此項技術中已為熟知。對於適於原核細胞與真核細胞之表現系統以及一般重組程序，參見 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 第 2 版, Sambrook, Fritsch and Maniatis 編 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 之第 16 章及第 17 章。在一些情況下，可能需要藉由使用桿狀病毒表現系統來表現重組多肽。該等桿狀

病毒表現系統之實例包括源自 pVL 之載體(諸如 pVL1392、pVL1393 及 pVL941)、源自 pAcUW 之載體(諸如 pAcUW1)，及源自 pBlueBac 之載體(諸如含 β -gal 之 pBlueBac III)。

在一較佳具體實例中，載體將經設計成在 CHO 細胞中產生本發明之 GDF 隅多肽，諸如 Pcmv-Script 載體(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4 載體(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 及 pCI-neo 載體(Promega, Madison, Wisc.)。顯而易見的是，本發明之基因構築體可用於使本發明之 GDF 隅多肽在培養物中增殖之細胞中表現，例如以產生蛋白質(包括融合蛋白或變異體蛋白)供純化。

本發明亦係關於一種經重組基因轉染之宿主細胞，該重組基因包括針對一或多種本發明 GDF 隅多肽之編碼序列(例如 SEQ ID NO: 4、5、25、27、30 或 31)。宿主細胞可為任何原核細胞或真核細胞。舉例而言，本發明之 GDF 隅多肽可在細菌細胞(諸如大腸桿菌)、昆蟲細胞(例如，使用桿狀病毒表現系統)、酵母或哺乳動物細胞中表現。其他適宜之宿主細胞為熟習此項技術者所知。

因此，本發明進一步係關於產生本發明 GDF 隅多肽之方法。舉例而言，經編碼 GDF 隅多肽之表現載體轉染之宿主細胞可在適當條件下培養，以允許 GDF 隅多肽之表現發生。GDF 隅多肽可由細胞與含有 GDF 隅多肽之培養基的混合物分泌且自該混合物中分離。或者，GDF 隅多肽可保存於細胞質或膜部分中，且將細胞收集，溶解並分離出蛋白質。細胞培養物包括宿主細胞、培養基及其他副產物。適

於細胞培養之培養基在此項技術中已為熟知。可使用此項技術中已知之蛋白質純化技術自細胞培養基、宿主細胞或兩者中分離本發明之 GDF 隈多肽，該等技術包括離子交換層析、凝膠過濾層析、超濾、電泳，及以對 GDF 隈多肽之特定抗原決定基具特異性的抗體進行免疫親和純化。在一較佳具體實例中，GDF 隈多肽為含有有助於其純化之結構域的融合蛋白。

另一具體實例中，編碼純化前導序列（諸如在重組 GDF 隈多肽之所要部分之 N 末端處的聚-(His)/腸激酶裂解位點序列）之融合基因可允許藉由使用 Ni^{2+} 金屬樹脂之親和層析來純化經表現之融合蛋白。接著，可藉由用腸激酶處理而隨後移除純化前導序列，以提供經純化之 GDF 隈多肽（例如，參見 Hochuli 等人，(1987) *J. Chromatography* 411:177；及 Janknecht 等人，*PNAS USA* 88:8972）。

製造融合基因之技術已為熟知。編碼不同多肽序列之各種 DNA 片段的連接基本上係根據習知技術，採用鈍末端或交錯末端以供接合、限制酶消化以提供適當末端、適當時填入黏性末端、鹼性磷酸酶處理以避免不當接合，及酶促接合來進行。在另一具體實例中，融合基因可由習知技術合成，該等技術包括自動化 DNA 合成器。或者，可使用在兩個連續基因片段之間產生互補懸垂序列（overhang）的錨定引子來進行基因片段之 PCR 擴增，該等互補懸垂序列隨後可經黏接以產生嵌合基因序列（參見，例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel 等人編，John Wiley

& Sons: 1992)。

4. 篩選檢定

在某些方面中，本發明係關於使用本發明之 GDF 隣多肽（例如可溶性變異體 ActRIIB 多肽）鑑別作為 ActRIIB 多肽之促效劑或拮抗劑的化合物（藥劑）。經由此篩選鑑別之化合物可經測試以評估其在活體內或試管內調節紅血球水平、血紅素水平及/或網狀紅血球水平的能力。舉例而言，可在動物模型中測試此等化合物。

存在許多藉由靶向 ActRIIB 發訊來篩選增加紅血球或血紅素水平之治療劑的方法。在某些具體實例中，可對化合物進行高產量篩選以鑑別干擾對所選細胞系之 ActRIIB 介導性作用的藥劑。在某些具體實例中，進行該檢定以篩選並鑑別特異性地抑制或降低 ActRIIB 多肽與其結合搭配物（諸如 ActRIIB 配位體，例如活化素、Nodal、GDF8、GDF11 或 BMP7）之結合的化合物。或者，該檢定可用於鑑別增強 ActRIIB 多肽與其結合搭配物（諸如 ActRIIB 配位體）之結合的化合物。在另一具體實例中，可藉由化合物與 ActRIIB 多肽相互作用之能力來鑑別該等化合物。

多種檢定格局將滿足需要，且根據本發明，本文中未明確描述之檢定格局仍將為一般熟習此項技術者所理解。如本文所述，本發明之測試化合物（藥劑）可由任何組合化學方法產生。或者，本發明化合物可為在活體內或試管內合成之天然產生的生物分子。舉例而言，欲對其充當組織生長調節劑之能力進行測試的化合物（藥劑）可由細菌、

酵母、植物或其他生物體產生（例如天然產物），由化學法產生（例如小分子，包括擬肽），或重組產生。本發明所涵蓋之測試化合物包括非肽基有機分子、肽、多肽、擬肽、糖、激素及核酸分子。在一特定具體實例中，測試劑為分子量小於約 2,000 道爾頓（Dalton）之有機小分子。

本發明之測試化合物可以單一不連續實體形式提供，或在複雜性較大之文庫中提供，諸如由組合化學法製得之文庫。此等文庫可包含例如醇、烷基鹵化物、胺、醯胺、酯、醛、醚及其他類別之有機化合物。測試化合物可以分離形式或化合物之混合物形式呈現給測試系統，尤其在初始篩選步驟中。視情況，化合物可視情況以其他化合物衍生化，且具有有助於分離化合物之衍生化基團。衍生化基團之非限制性實例包括生物素、螢光素、地高辛（digoxigenin）、綠色螢光蛋白、同位素、聚組胺酸、磁珠、麩胱甘肽 S 轉移酶（GST）、光可活化交聯劑或其任何組合。

在測試化合物及天然提取物文庫之許多藥物篩選程式中，需要高產量檢定以使特定時段內所調查之化合物數目達到最大。在無細胞系統（諸如可以經純化或經半純化之蛋白質得到之系統）中進行之檢定作為「初步」篩選通常較佳，此係由於所產生之該等系統允許快速顯現且相對容易地偵測測試化合物所介導之分子標靶中的變化。此外，在試管內系統中一般可忽略測試化合物之細胞毒性或生體可用率的影響，替代地，檢定主要聚焦於藥物對分子標靶之影響，如可在 ActRIIB 多肽與其結合搭配物（例如 ActRIIB

配位體)之間的結合親和力之變化中體現。

僅為說明起見，在本發明之一例示性篩選檢定中，適當時，使相關化合物與一般能夠與 ActRIIB 配位體結合之經分離及經純化 ActRIIB 多肽接觸，以達成檢定目的。接著，向含有 ActRIIB 配位體之組成物中添加該化合物與 ActRIIB 多肽之混合物。ActRIIB/ActRIIB 配位體複合物之偵測及定量提供測定化合物在抑制(或增強)ActRIIB 多肽與其結合蛋白之間複合物形成方面之功效的方式。化合物之功效可藉由自使用多種濃度之測試化合物所獲得之數據產生劑量反應曲線來評估。此外，亦可進行對照檢定以提供供比較用之基線。舉例而言，在對照檢定中，向含有 ActRIIB 多肽之組成物中添加經分離及經純化之 ActRIIB 配位體，且在不存在測試化合物的情況下定量 ActRIIB/ActRIIB 配位體複合物之形成。應瞭解，反應物混合之順序一般可改變，且可同時混合。此外，可使用細胞提取物及溶胞產物替代經純化蛋白質以獲得適宜之無細胞檢定系統。

ActRIIB 多肽與其結合蛋白之間的複合物形成可由多種技術偵測。舉例而言，可藉由免疫檢定或藉由層析偵測，使用例如經可偵測標記之蛋白質來定量複合物形成之調節，該等經可偵測標記之蛋白質為諸如經放射性標記(例如 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H)、經螢光標記(例如 FITC)或經酶促標記之 ActRIIB 多肽或其結合蛋白。

在某些具體實例中，本發明預期使用螢光偏振檢定及螢光共振能量轉移(FRET)檢定來直接或間接地量測

ActRIIB 多肽與其結合蛋白之間的相互作用程度。此外，其他偵測模式與本發明之許多具體實例相容，諸如基於光波導 (PCT 公開案 WO 96/26432 及美國專利第 5,677,196 號)、表面電漿共振 (SPR)、表面電荷感應器及表面力感應器之偵測模式。

此外，本發明預期使用相互作用阱檢定 (亦稱為「雙雜交檢定」) 來鑑別破壞或增強 ActRIIB 多肽與其結合搭配物之間相互作用的藥劑。參見，例如美國專利第 5,283,317 號；Zervos 等人 (1993) *Cell* 72:223-232；Madura 等人 (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054；Bartel 等人 (1993) *Biotechniques* 14:920-924；及 Iwabuchi 等人 (1993) *Oncogene* 8:1693-1696。在一特定具體實例中，本發明預期使用反向雙雜交系統來鑑別使 ActRIIB 多肽與其結合蛋白之間的相互作用解離的化合物 (例如小分子或肽)。參見，例如 Vidal 及 Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29；Vidal 及 Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81；及美國專利第 5,525,490 號、第 5,955,280 號及第 5,965,368 號。

在某些具體實例中，本發明化合物係藉由其與 ActRIIB 多肽相互作用之能力來鑑別。化合物與 ActRIIB 多肽之間的相互作用可為共價或非共價相互作用。舉例而言，該相互作用可在蛋白質水平上使用試管內生物化學方法來鑑別，包括光交聯、經放射性標記之配位體結合及親和層析 (Jakoby WB 等人, 1974, *Methods in Enzymology* 46:1)。在

某些狀況下，可在基於機制之檢定中篩選化合物，諸如偵測與 ActRIIB 多肽結合之化合物的檢定。此可包括固相或流體相結合事件。或者，編碼 ActRIIB 多肽之基因可經報導體系統（例如 β -半乳糖苷酶、螢光素酶或綠色螢光蛋白）轉染至細胞中，且較佳藉由高產量篩選針對文庫進行篩選，或以文庫之個別成員進行篩選。可使用其他基於機制之結合檢定，例如偵測自由能變化之結合檢定。可用固定至孔、珠粒或晶片之標靶或經固定化抗體捕捉之標靶或由毛細管電泳法解析之標靶來進行結合檢定。通常可使用比色法或螢光法或表面電漿共振來偵測所結合之化合物。

5. 例示性治療用途

在某些具體實例中，本發明之 GDF 阈多肽可用於增加哺乳動物（諸如齧齒動物及靈長類動物，且尤其是人類）患者中之紅血球水平。在某些具體實例中，本發明提供藉由向有需要之個體投予治療有效量之 GDF 阈多肽來治療或預防該個體之貧血的方法。此等方法可用於治療性及預防性處理哺乳動物，且尤其是人類。

如本文所用之「預防」病症或病狀之治療劑係指在統計樣本中，使經治療樣本之該病症或病狀之發病率相對於未經治療之對照樣本減少，或使該病症或病狀之一或多種症狀的發作相對於未經治療之對照樣本延遲或使其嚴重度降低的化合物。如本文所用之術語「治療」包括預防指定病狀，或在病狀已確定後即改善或消除該病狀。在任一狀況下，可以醫師或其他健康照護提供者所提供之診斷及投

予治療劑之預期結果來辨別預防或治療。

如本文所示，GDF 隣多肽可用於增加健康個體中之紅血球水平、血紅素水平或網狀紅血球水平，且該等 GDF 隣多肽可用於所選患者群體。適當患者群體之實例包括：具有不當較低紅血球或血紅素水平之患者，諸如患有貧血之患者；及處於發展不當較低紅血球或血紅素水平之風險下的患者，諸如即將進行重大手術或可能造成實質性失血之其他程序的彼等患者。在一具體實例中，以 GDF 隣多肽治療具有充足紅血球水平之患者以增加紅血球水平，且接著抽取血液並儲存以供稍後輸血用。

本文所揭示之 GDF 隣多肽可用於增加患有貧血之患者中的紅血球水平。當觀測人類之血紅素水平時，對於適當年齡及性別分類而言，小於正常值之水平可表示貧血，而個體差異應考慮在內。舉例而言，在一般成年群體中，12 g/dl 之血紅素水平一般視為正常值之下限。潛在原因包括失血、營養缺乏、藥物反應、各種骨髓問題及許多疾病。更特定言之，貧血與多種病症相關，該等病症包括例如慢性腎衰竭、脊髓發育不良症候群、類風濕性關節炎、骨髓移植。貧血亦可與以下病狀相關：實體腫瘤（例如乳癌、肺癌、結腸癌）；淋巴系統腫瘤（例如慢性淋巴性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤（non-Hodgkins lymphoma）及霍奇金氏淋巴瘤（Hodgkins lymphoma））；造血系統腫瘤（例如白血病、脊髓發育不良症候群、多發性骨髓瘤）；放射治療；化療（例如含鉑攝生法）；發炎性及自體免疫疾病，包括（但

不限於) 類風濕性關節炎、其他發炎性關節炎性皮疹、全身性紅斑性狼瘡 (SLE)、急性或慢性皮膚病 (例如牛皮癬)、發炎性腸病 (例如克羅恩氏病 (Crohn's disease) 及潰瘍性結腸炎)；急性或慢性腎病或腎衰竭，包括特發性或先天性病狀；急性或慢性肝病；急性或慢性出血；因患者異體抗體或自體抗體及/或出於宗教原因 (例如一些耶和華見證人 (Jehovah's Witness)) 而不可能輸注紅血球之情況；感染 (例如瘧疾、骨髓炎)；血紅素病，包括例如鐮狀細胞病、地中海貧血 (thalassemia)；藥物使用或濫用，例如酒精濫用；患有因避免輸血之任何原因所致之貧血的兒科患者；及年長患者或因擔心循環超載而不能接受輸血的患有潛在心肺疾病與貧血的患者。

GDF 隣多肽將適於治療低增生性骨髓貧血，該等貧血典型地與紅血球 (RBC) 形態之較小變化相關。低增生性貧血包括：1) 慢性病之貧血；2) 腎病之貧血；及 3) 與低代謝狀況相關之貧血。在此等類型中之每一者中，內源紅血球生成素水平對於所觀察之貧血程度而言均不適當地較低。其他低增生性貧血包括：4) 早期缺鐵性貧血，及 5) 由骨髓損傷造成之貧血。在此等類型中，內源紅血球生成素水平對於所觀察之貧血程度而言均適當地較高。

最常見類型為慢性病之貧血，其涵蓋炎症、感染、組織損傷及諸如癌症之病狀，且係由低紅血球生成素水平與骨髓中紅血球生成素反應不足來辨別 (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 第 17 版，

McGraw Hill, New York, 第 628 至 634 頁)。許多因素可促成癌症相關貧血。一些因素與疾病進程本身及發炎性細胞介素(諸如介白素-1、干擾素- γ 及腫瘤壞死因子)之產生相關(Bron 等人, 2001, Semin Oncol 28 (增刊 8):1-6)。在其作用中, 炎症誘導關鍵鐵調節肽-鐵調素(hepcidin), 從而抑制自巨噬細胞之鐵輸出且一般限制鐵對紅血球生成之可用性(Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400)。經由各種途徑之失血亦可促成癌症相關貧血。癌症發展所致之貧血盛行率隨癌症類型而變, 其處於前列腺癌中之 5%至多發性骨髓瘤中之 90%之範圍內。癌症相關貧血對患者具有深遠影響, 包括疲倦及生活品質降低、治療功效降低及死亡率增加。

慢性腎病與嚴重度隨腎損傷程度而變之低增生性貧血相關。該貧血主要歸因於紅血球生成素產生不足及紅血球存活較低。慢性腎病通常經數年或數十年逐步發展成晚期(第 5 期)疾病, 居時需要進行透析或腎移植以使患者存活。在此過程中, 貧血常常較早出現且隨疾病發展而惡化。腎病之貧血的臨床結果有詳盡文獻記載, 且包括左心室肥大發展、認知功能受損、生活品質降低及免疫功能改變(Levin 等人, 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20 (增刊 1):21-24; Revicki 等人, 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter 等人, 1994, Kidney Int 45:224-231)。如申請者在慢性腎病之小鼠模型中所說明(參見以下實施例), GDF 隅多肽可用於治療腎病之貧血。

低代謝率所致之許多病狀可產生輕度至中度低增生性貧血。該等病狀為內分泌不足狀況。舉例而言，貧血可在艾迪森氏病 (Addison's disease)、甲狀腺機能減退、副甲狀腺機能亢進或者經閹割或以雌激素治療之男性中出現。輕度至中度貧血亦可伴有蛋白質之膳食攝入量降低 (在老年人中尤其盛行之病狀)。最後，貧血可在幾乎任何原因所引起之慢性肝病患者中出現 (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 第 17 版, McGraw Hill, New York、第 628-634 頁)。

急性大量失血所致之貧血 (諸如因創傷或產後出血) 被稱為急性出血後貧血。急性失血最初因 RBC 以及其他血液成份成比例地耗竭而導致血容量減少，而非貧血。然而，血容量減少將迅速觸發體液自血管外向血管腔隙轉移之生理機制，該生理機制導致血液稀釋及貧血。若為慢性失血，則失血逐步耗竭體內鐵儲量，且最終導致鐵缺乏。如申請者在小鼠模型中所說明 (參見以下實施例)，GDF 鮮多肽可用於加速自急性失血之貧血復原。

缺鐵性貧血為鐵缺乏增加之分級進程中的最後階段，該進程包括作為中間階段之負離子平衡及缺鐵性紅血球生成。鐵缺乏可導致鐵需求增加、鐵攝入量減少或鐵流失增加，如在諸如懷孕、膳食不當、腸吸收不良、急性或慢性炎症及急性或慢性失血之狀況中所例示。在此類型之輕度至中度貧血情況下，骨髓保持低增生，且 RBC 形態大部分正常；然而，即便輕度貧血仍可產生一些小球性低色素性

RBC，且向嚴重缺鐵性貧血的轉變伴隨有骨髓過度增生以及小球性及低色素性 RBC 日益盛行 (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 第 17 版, McGraw Hill, New York, 第 628-634 頁)。缺鐵性貧血之適當治療視其病因及嚴重度而定，以經口鐵製劑、非經腸鐵調配物及 RBC 輸注作為主要習知選擇。GDF 隣多肽可單獨或與習知治療方法組合用於治療慢性缺鐵性貧血，尤其用於治療源於多因素之貧血。

低增生性貧血可由骨髓之原發性功能障礙或衰竭，而非繼發於炎症、感染或癌症發展之功能障礙引起。突出實例為癌症化療性藥物或癌症放射治療所引起之骨髓抑制。對臨床試驗之廣泛回顧發現在進行化療之後 100% 的患者中可出現輕度貧血，而在高達 80% 之該等患者中可出現較嚴重貧血 (Groopman 等人, 1999, J Natl Cancer Inst 91:1616-1634)。骨髓抑制藥物包括：1) 烷化劑，諸如氮芥 (例如美法侖 (melphalan)) 及亞硝基脲 (例如鏈脲佐菌素 (streptozocin))；2) 抗代謝物，諸如葉酸拮抗劑 (例如甲胺喋呤 (methotrexate))、嘌呤類似物 (例如硫鳥嘌呤 (thioguanine))，及嘧啶類似物 (例如吉西他濱 (gemcitabine))；3) 細胞毒性抗生素，諸如蒽環黴素 (anthracycline) (例如阿黴素 (doxorubicin))；4) 激酶抑制劑 (例如吉非替尼 (gefitinib))；5) 有絲分裂抑制劑，諸如紫杉烷 (taxane) (例如太平洋紫杉醇 (paclitaxel)) 及長春花鹼 (vinca alkaloid) (例如長春瑞濱 (vinorelbine))；

6) 單株抗體 (例如利妥昔單抗 (rituximab))；及 7) 拓撲異構酶抑制劑 (例如拓朴替康 (topotecan) 及依託泊昔 (etoposide))。如在化療誘發之貧血的小鼠模型中所說明 (參見以下實施例)，GDF 隣多肽可用於治療化療劑及/或放射治療所致之貧血。

GDF 隣多肽亦適於治療異常 RBC 成熟之貧血，其特徵部分在於尺寸過小 (小球性)、尺寸過大 (大球性)、畸形或異常著色 (低色素性) 之 RBC。

可用欲使患者恢復至目標血紅素水平之給藥攝生法來治療患者，該目標血紅素水平通常介於約 10 g/dl 與約 12.5 g/dl 之間，且典型地為約 11.0 g/dl (亦參見 Jacobs 等人 (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19)，而較低目標水平可產生較少心血管副作用。或者，可使用血容比水平 (血球佔血液樣本之體積百分比) 作為紅血球狀況之量度。健康個體之血容比水平對於成年男性而言在 41% 至 51% 之範圍內，且對於成年女性而言在 35% 至 45% 之範圍內。目標血容比水平通常約為 30-33%。此外，血紅素/血容比水平因人而異。因此，最佳地，目標血紅素/血容比水平對各患者可個別化。

本文所揭示之 GDF 隣多肽對紅血球水平之快速作用表明此等藥劑係以不同於 Epo 之機制起作用。因此，此等拮抗劑可適用於增加對 Epo 反應不良之患者的紅血球及血紅素水平。舉例而言，投予正常至較高 (>300 IU/公斤/週) 劑量之 Epo 並不引起血紅素水平增至目標水平的患者可受

益於 GDF 隈多肽。在所有類型之貧血中皆發現對 Epo 反應不足之患者，但在癌症患者及晚期腎病患者中已尤其頻繁地觀測到較大數目之非反應者 (non-responder)。對 Epo 反應不足可為組成性 (亦即，以 Epo 第一次治療時所觀測) 或獲得性 (例如以 Epo 反覆治療時所觀測) 的。

GDF 隈多肽亦可用於治療對 Epo 之不良反應敏感的患者。Epo 之主要不良反應為血容比或血紅素水平過度增加及紅血球增多。高血容比水平可引起高血壓 (更特定言之，高血壓加劇) 及血管血栓形成。Epo 之其他不良反應已有報導 (其中一些與高血壓有關)，該等不良反應為頭痛、類流感狀症候群、旁路阻塞、心肌梗塞，及血栓形成、高血壓性腦病及紅血球再生不良所引起之腦痙攣 (Singibarti, (1994) *J. Clin Investig* 72 (增刊 6), S36-S43; Horl 等人 (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15 (增刊 4), 51-56; Delanty 等人 (1997) *Neurology* 49, 686-689; Bunn (2002) *N Engl J Med* 346 (7), 522-523)。

GDF 隈亦可與 Epo 及活化紅血球生成素路徑之其他藥劑組合使用。在一些情況下，此可允許組合中各藥物之劑量降低。

在某些具體實例中，本發明提供藉由量測患者之一或多個血液學參數來控制已用 GDF 隈多肽治療之患者或作為欲用 GDF 隈多肽治療之候選者之患者的方法。血液學參數可用於評估對於作為欲用 GDF 隈多肽治療之候選者之患者的適當劑量，以在用 GDF 隈多肽治療期間監控血液學參

數，在用 GDF 隅多肽治療期間評估是否調整劑量，及/或評估 GDF 階多肽之適當維持劑量。若一或多個血液學參數處於正常水平以外，則可減少、延遲或終止用 GDF 階多肽給藥。

可根據本文所提供之方法量測的血液學參數包括例如紅血球水平、血壓、鐵儲量，及使用經技術公認之方法在體液中發現的與紅血球水平增加相關之其他藥劑。可使用患者之血液樣本來測定該等參數。舉例而言，紅血球水平、血紅素水平及/或血容比水平增加可導致血壓升高。

在一具體實例中，在作為欲用 GDF 階多肽治療之候選者的患者中，若一或多個血液學參數處於正常範圍以外，或比正常水平偏高，則可使開始投予 GDF 階多肽延遲，直至血液學參數已天然地或經由治療介入而返回至正常或可接受水平為止。舉例而言，若候選患者患有高血壓或處於高血壓前期，則該患者可用降血壓劑治療以降低患者之血壓。適於個別患者病狀之任何降血壓劑皆可使用，包括例如利尿劑、腎上腺素抑制劑（包括 α 阻斷劑及 β 阻斷劑）、血管擴張劑、鈣通道阻斷劑、血管緊縮素轉化酶（ACE）抑制劑或血管緊縮素 II 受體阻斷劑。或者，可使用膳食及運動攝生法來治療血壓。類似地，若候選患者的鐵儲量低於正常值或比正常值偏低，則該患者可用適當膳食及/或鐵補充之攝生法治療，直至該患者之鐵儲量已返回至正常或可接受水平為止。對於紅血球水平及/或血紅素水平高於正常水平的患者而言，則可延遲投予 GDF 階多肽直至該等水平

已返回至正常或可接受水平為止。

在某些具體實例中，在作為欲用 GDF 隅多肽治療之候選者的患者中，若一或多個血液學參數處於正常範圍以外或比正常值偏高，則可不使開始投藥延遲。然而，GDF 階多肽之給藥劑量或頻率可設定為將降低投予 GDF 階多肽時引起血液學參數不可接受地增加之風險的量。或者，可針對患者開發將 GDF 階多肽與處理血液學參數之不當水平之治療劑組合的治療攝生法。舉例而言，若患者患有高血壓，則可設計一種治療攝生法，該治療攝生法包括投予 GDF 階多肽及降血壓劑。對於低於所要鐵儲量之患者，可開發 GDF 階多肽及補鐵之治療攝生法。

在一具體實例中，可針對作為欲用 GDF 階多肽治療之候選者的患者確立一或多個血液學參數之基線參數，且基於該（該等）基線值確立針對彼患者之適當給藥攝生法。或者，可使用基於患者之醫學病史確立之基線參數以告知針對患者之適當 GDF 階多肽給藥攝生法。舉例而言，若健康患者具有高於規定正常範圍之經確立基線血壓讀數，則可能不必在用 GDF 階多肽治療之前使患者之血壓處於對一般群體而言視為正常的範圍內。在用 GDF 階多肽治療之前患者之一或多個血液學參數的基線值亦可用作相關比較值以監控在用 GDF 階多肽治療期間該等血液學參數之任何變化。

在某些具體實例中，量測正用 GDF 階多肽治療之患者的一或多個血液學參數。該等血液學參數可用於在治療期

間監控患者，且允許調整或終止 GDF 隅多肽之給藥或另一治療劑之額外給藥。舉例而言，若投予 GDF 階多肽導致血壓、紅血球水平或血紅素水平升高或導致鐵儲量減少，則可在量及頻率方面減少 GDF 階多肽之給藥，以降低 GDF 階多肽對一或多個血液學參數之影響。若投予 GDF 階多肽產生不利於患者的一或多個血液學參數之變化，則可暫時終止給予 GDF 階多肽直至該（該等）血液學參數返回至可接受之水平為止，或可永久終止給藥。類似地，若在減少 GDF 階多肽之投藥劑量或頻率之後一或多個血液學參數並未處於可接受之範圍內，則可終止給藥。作為減少或終止給予 GDF 階多肽之替代方案或除此以外，可向患者給予處理血液學參數之不當水平的額外治療劑，諸如降血壓劑或鐵補充劑。舉例而言，若正用 GDF 階多肽治療之患者患有高血壓，則可以相同水平繼續給予 GDF 階多肽並向該治療攝生法中添加降血壓劑，可減少給予 GDF 階多肽（例如在量及/或頻率方面）並向該治療攝生法中添加降血壓劑，或可終止給予 GDF 階多肽並可用降血壓劑治療該患者。

在某些具體實例中，正用 GDF 階多肽治療之患者或欲用 GDF 階多肽治療之候選患者為有肌肉生長需要之患者，諸如罹患神經肌肉異常或肌肉生成異常或處於出現該等病症之風險下的患者。舉例而言，患者或候選患者可罹患以下疾病或處於出現以下疾病之風險下：路-蓋里格氏病 (Lou Gehrig's disease, ALS)、癌症厭食-惡病質症候群、肌肉營養不良症、肌肉萎縮、充血性阻塞性肺病（及與 COPD 相

關之肌肉消瘦)、肌肉消瘦症候群、肌肉減少症或惡病質。肌肉營養不良症係指一組退化性肌肉疾病，其特徵在於骨骼肌及有時心臟及呼吸肌逐步衰弱及退化。可用包括本發明 GDF 隣多肽之攝生法治療之例示性肌肉營養不良症包括：裘馨型肌肉營養不良症 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)、貝克型肌肉營養不良症 (Becker Muscular Dystrophy, BMD)、艾德型肌肉營養不良症 (Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, EDMD)、肢帶型肌肉營養不良症 (Limb-Girdle Muscular Dystrophy, LGMD)、顏肩肱型肌肉營養不良症 (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSH 或 FSHD) (亦稱為蘭德氏病 (Landouzy-Dejerine))、肌強直性營養不良 (MMD) (亦稱為史殿納氏病 (Steinert's Disease))、眼咽肌肉營養不良症 (OPMD)、遠端型肌肉營養不良症 (DD)、先天性肌肉營養不良症 (CMD)。

6. 醫藥組成物

在某些具體實例中，本發明之化合物 (例如 GDF 隣多肽) 係與醫藥學上可接受之載劑一起調配。舉例而言，GDF 隣多肽可單獨投予，或作為藥物調配物 (治療組成物) 之組份投予。本發明化合物可經調配以供依任何便利之方式投予，從而用於人用或畜用藥物中。

在某些具體實例中，本發明之治療方法包括全身投予組成物，或以植入物或裝置形式局部投予。投予時，用於本發明之治療組成物固然呈無熱原質且生理學上可接受之形式。在本發明之方法中，非 GDF 隣多肽且亦可視情況包

括於如上文所述之組成物中的治療學上適用之藥劑可與本發明化合物（例如 GDF 隆多肽）同時或依序投予。

典型地，將非經腸投予化合物。適於非經腸投予之醫藥組成物可包含一或多種 GDF 隆多肽以及以下一或多者：醫藥學上可接受之無菌等張水溶液或非水溶液、分散液、懸浮液或乳液；或無菌粉末，其可在臨用前復原成無菌可注射溶液或分散液，該等溶液或分散液可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、促使調配物與預期接受者之血液等張的溶質，或懸浮劑或增稠劑。可用於本發明之醫藥組成物中的適宜水性載劑及非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇（諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及其類似物）及其適宜之混合物、植物油（諸如橄欖油），及可注射有機酯（諸如油酸乙酯）。舉例而言，可藉由使用塗佈材料（諸如卵磷脂），在分散液之狀況下藉由維持所需粒度，且藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。

此外，組成物可以用於向目標組織位點（例如骨髓）遞送之形式囊封或注射。在某些具體實例中，本發明之組成物可包括能夠向目標組織位點（例如骨髓）遞送一或多種治療性化合物（例如 GDF 隆多肽）的基質，從而提供用於發展組織且最佳能夠被再吸收至體內的結構。舉例而言，基質可提供 GDF 隆多肽的緩慢釋放。該等基質可由目前用於其他植入式醫學應用的材料形成。

基質之選擇係基於生物相容性、生物降解性、機械性質、裝飾性外觀及介面性質。本發明組成物之特定應用將

定義適當調配物。該等組成物之潛在基質可為生物可降解且化學上經定義之硫酸鈣、磷酸三鈣、羥磷灰石、聚乳酸及聚酐。其他潛在材料為生物可降解的且生物學上經充分定義，諸如骨膠原蛋白或皮膚膠原蛋白。其他基質包含純蛋白質或細胞外基質組份。其他潛在基質為非生物可降解的且化學上經定義，諸如燒結羥磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽或其他陶瓷。基質可包含上文所提及之任何類型材料的組合，諸如聚乳酸與羥磷灰石，或膠原蛋白與磷酸三鈣。生物陶瓷之組成可改變（諸如在鈣-鋁酸鹽-磷酸鹽中）且經處理以改變孔徑、粒度、顆粒形狀及生物降解性。

在某些具體實例中，本發明之方法可供經口投予，例如以下列形式：膠囊、扁膠囊、丸劑、錠劑、口含劑（使用調味基底，通常為蔗糖及阿拉伯膠（acacia）或黃蓍膠（tragacanth））、散劑、顆粒；或於水性液體或非水液體中之溶液或懸浮液；或水包油或油包水液體乳液；或酏劑或糖漿；或片劑（使用惰性基劑，諸如明膠與甘油或蔗糖與阿拉伯膠）；及/或漱口劑及其類似物，其各含有預定量之藥劑作為活性成份。藥劑亦可以大丸劑（bolus）、舐劑或糊劑形式投予。

在供經口投予之固體劑型（膠囊、錠劑、丸劑、糖衣錠、散劑、顆粒及其類似物）中，本發明之一或多種治療性化合物可與一或多種醫藥學上可接受之載劑混合，該等載劑為諸如檸檬酸鈉或磷酸二鈣及/或以下任一者：（1）填充劑或增量劑，諸如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖

醇及/或矽酸；(2) 黏合劑，諸如羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖及/或阿拉伯膠；(3) 保濕劑，諸如甘油；(4) 崩解劑，諸如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些矽酸鹽及碳酸鈉；(5) 溶液阻滯劑，諸如石蠟；(6) 吸收加速劑，諸如四級銨化合物；(7) 濕潤劑，諸如鯨蠟醇及單硬脂酸甘油酯；(8) 吸收劑，諸如高嶺土及膨潤土；(9) 潤滑劑，諸如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉及其混合物；及(10) 著色劑。在膠囊、錠劑及丸劑之狀況下，醫藥組成物亦可包含緩衝劑。在使用諸如乳糖以及高分子量聚乙二醇及其類似物之賦形劑的軟性填充膠囊及硬性填充膠囊中，類似類型之固體組成物亦可用作填充劑。

供經口投予之液體劑型包括醫藥學上可接受之乳液、微乳劑、溶液、懸浮液、糖漿及酏劑。除活性成份以外，液體劑型可含有此項技術中常用之惰性稀釋劑，諸如水或其他溶劑；增溶劑及乳化劑，諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油類（詳言之，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油）、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇及脫水山梨糖醇脂肪酸酯；及其混合物。除惰性稀釋劑以外，口服組成物亦可包括佐劑，諸如濕潤劑、乳化劑及懸浮劑、甜味劑、調味劑、著色劑、芳香劑及防腐劑。

除活性化合物以外，懸浮液亦可含有懸浮劑，諸如乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇及脫水山梨糖醇酯、

微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃蓍膠及其混合物。

本發明之組成物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由包括各種抗細菌劑及抗真菌劑來確保阻止微生物作用，該等抗細菌劑及抗真菌劑為例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其類似物。亦可能需要將等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似物包括於組成物中。此外，可藉由包括延遲吸收之試劑（諸如單硬脂酸鋁及明膠）來延長可注射醫藥形式之吸收。

應瞭解，給藥攝生法將由主治醫師在考慮調節本發明化合物（例如 GDF 隅多肽）之作用的多種因素下確定。多種因素包括（但不限於）：患者之紅血球計數、血紅素水平或其他診斷性評估結果，所要目標紅血球計數，患者之年齡、性別及膳食，可促成紅血球水平降低之任何疾病的嚴重度，投藥時間，及其他臨床因素。向最終組成物中添加其他已知生長因子亦可影響劑量。可藉由週期性地評估紅血球及血紅素水平以及評估網狀紅血球水平及其他造血過程之指標來監控進程。

在某些具體實例中，本發明亦提供在活體內產生 GDF 階多肽之基因治療。該治療將藉由向帶有上文所列之病症的細胞或組織中引入 GDF 階多核苷酸序列來達成其治療效果。可使用重組表現載體（諸如嵌合病毒）或膠體分散系統來達成 GDF 階多核苷酸序列之遞送。GDF 階多核苷酸序列之治療性遞送較佳使用靶向脂質體。

如本文所教示的可用於基因治療之多種病毒載體包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒或 RNA 病毒（諸如反轉錄病毒）。反轉錄病毒載體可能為鼠類或鳥類反轉錄病毒之衍生物。可插入單一外來基因之反轉錄病毒載體的實例包括（但不限於）：莫洛尼鼠類白血病病毒（Moloney murine leukemia virus，MoMuLV）、哈維鼠類肉瘤病毒（Harvey murine sarcoma virus，HaMuSV）、鼠類乳腺腫瘤病毒（MuMTV）及勞氏肉瘤病毒（Rous Sarcoma Virus，RSV）。許多其他反轉錄病毒載體可併有多個基因。所有此等載體皆可轉移或併有針對可選擇標記之基因，以便可鑑別並產生經轉導之細胞。可藉由連接（例如）糖、糖脂或蛋白質使反轉錄病毒載體對標靶具特異性。較佳靶向係使用抗體來實現。熟習此項技術者應瞭解，可將特異性多核苷酸序列插入反轉錄病毒基因組中或與病毒包膜連接，以允許標靶特異性地遞送含有 GDF 阵多核苷酸之反轉錄病毒載體。

或者，可藉由習知磷酸鈣轉染以編碼反轉錄病毒結構基因 gag、pol 及 env 之質體直接轉染組織培養細胞。接著，以含有相關基因之載體質體轉染此等細胞。所得細胞向培養基中釋放反轉錄病毒載體。

GDF 阵多核苷酸之另一靶向遞送系統為膠體分散系統。膠體分散系統包括大分子複合物、奈米膠囊、微球體、珠粒，及包括水包油乳液、微胞、混合型微胞及脂質體的基於脂質之系統。本發明之較佳膠體系統為脂質體。脂質體為適用作試管內及活體內遞送媒介之人工膜囊。RNA、

DNA 及完整病毒粒子可囊封於水體內部，且以生物活性形式遞送至細胞中（參見，例如 Fraley 等人，Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981）。使用脂質體媒劑進行有效基因轉移之方法在此項技術中已知，參見，例如 Mannino 等人，Biotechniques, 6:682, 1988。脂質體之組成物通常為磷脂之組合，其通常與類固醇、尤其膽固醇組合。亦可使用其他磷脂或其他脂質。脂質體之物理特徵視 pH 值、離子濃度及二價陽離子存在而定。

適用於產生脂質體之脂質的實例包括磷脂醯基化合物，諸如磷脂醯甘油、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲氨酸、磷脂醯乙醇胺、鞘脂、腦苷脂及神經節苷脂。說明性磷脂包括卵磷脂醯膽鹼、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼及二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。脂質體之靶向亦可能係基於例如器官特異性、細胞特異性及細胞器特異性，且在此項技術中已知。

範例

現對本發明進行一般描述，藉由參考以下實施例將更易於理解本發明，該等實施例僅出於說明本發明之某些具體實例之目的而包括在內，而並不意欲限制本發明。

實施例 1. 產生 GDF 饅

申請者如下構築 GDF 饅。使具有經修飾之 ActRIIB 胞外域且與活化素 A 之結合性相對於 GDF11 及 / 或肌肉抑制素大幅降低（因在 SEQ ID NO: 1 之位置 79 處天門冬氨酸取代白氨酸）的多肽與人類或小鼠 Fc 域以其間的最小連接子（3 個甘氨酸胺基酸）融合。該等構築體分別稱為 ActRIIB(L79D

20-hFc 及 ActRIIB(L79D 20-134)-mFc。在位置 79 以麩胺酸而非天門冬胺酸之替代形式類似地進行 (L79E)。下文亦產生在關於 SEQ ID NO: 7 之位置 226 以丙胺酸而非纈胺酸之替代形式，且在所有測試方面皆同樣地進行。位置 79 之天門冬胺酸 (相對於 SEQ ID NO: 1，或相對於 SEQ ID NO: 7 之位置 60) 在下文中以灰色突出顯示。相對於 SEQ ID NO: 7 之位置 226 的纈胺酸在下文中亦以灰色突出顯示。

以下展示自 CHO 細胞系純化之 GDF 隊 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 7)。

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKR
 LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEEN
 PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGG
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

GDF 隊之源自 ActRIIB 之部分具有以下所示之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 32)，且彼部分可呈單體形式或呈單體、二聚體或更高級複合物形式的非 Fc 融合蛋白形式。

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKR
 LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEEN
 PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

(SEQ ID NO: 32)

GDF 隅蛋白係在 CHO 細胞系中表現。考慮三種不同前導序列：

(i) 蜜蜂毒素 (HBML) : MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
(SEQ ID NO: 8) ;

(ii) 組織纖維蛋白溶酶原活化子 (TPA) :
MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9) ;

(iii) 原生序列 : MTAPWVALALLWGSLCAGS (SEQ ID NO : 10) 。

所選形式採用 TPA 前導序列，且具有以下未經處理之胺基酸序列：

MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIY
YNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNE
RFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGHTCPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPVPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11) 。

此多肽係由以下核酸序列 (SEQ ID NO: 12) 編碼：

A	TGGATGCAAT	GAAGAGAGGG	CTCTGCTGTG
TGCTGCTGCT		GTGTGGAGCA	GTCTTCGTTT

CGCCCGGGCGC	CTCTGGGCGT	GGGGAGGCTG
AGACACGGGA	GTGCATCTAC	TACAACGCCA
ACTGGGAGCT	GGAGCGCACC	AACCAGAGCG
GCCTGGAGCG	CTGCGAAGGC	GAGCAGGACA
AGCGGCTGCA	CTGCTACGCC	TCCTGGCGCA
ACAGCTCTGG	CACCATCGAG	CTCGTGAAGA
AGGGCTGCTG	GGACGATGAC	TTCAACTGCT
ACGATAGGCA	GGAGTGTGTG	GCCACTGAGG
AGAACCCCCA	GGTGTACTTC	TGCTGCTGTG
AAGGCAACTT	CTGCAACGAG	CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA	GGCTGGGGGC	CCGGAAGTCA
CGTACGAGCC	ACCCCCGACA	GCCCCCACCG
GTGGTGGAAC	TCACACATGC	CCACCGTGCC
CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG
TCTTCCTCTT	CCCCCCAAAA	CCCAAGGACA
CCCTCATGAT	CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT	GGTGGACGTG	AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT	CAAGTTCAAC	TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA
AGCCGCGGGA	GGAGCAGTAC	AACAGCACGT
ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTCCTGC
ACCAGGACTG	GCTGAATGGC	AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA	GCCCTCCCAG
TCCCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAAGCCA

AAGGGCAGCC	CCGAGAACCA	CAGGTGTACA
CCCTGCCCCC	ATCCCGGGAG	GAGATGACCA
AGAACCCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA	TCCCAGCGAC	ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGGAGAACAA
ACTACAAGAC	CACGCCTCCC	GTGCTGGACT
CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TATAGCAAGC
TCACCGTGGA	CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT	CTCATGCTCC	GTGATGCATG
AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAAGA
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA		

純化可由一系列管柱層析步驟達成，包括例如以任何順序進行以下三者或超過三者：蛋白質 A 層析、Q 瓊脂糖層析、苯基瓊脂糖層析、尺寸排阻層析及陽離子交換層析。純化可以病毒過濾及緩衝液交換來完善。在純化流程之實例中，使細胞培養基通過蛋白質 A 管柱，在 150 mM Tris/NaCl (pH 8.0) 中洗滌，接著在 50 mM Tris/NaCl (pH 8.0) 中洗滌，且用 0.1 M 甘胺酸 (pH 3.0) 溶離。將低 pH 值溶離液在室溫下保持 30 分鐘，作為病毒清除步驟。接著中和溶離液，且使其通過 Q 瓊脂糖離子交換管柱，且在 50 mM Tris (pH 8.0)、50 mM NaCl 中洗滌，並在 50 mM Tris (pH 8.0) 中以 150 mM 與 300 mM 之間的 NaCl 濃度進行溶離。接著將溶離液轉換至 50 mM Tris (pH 8.0)、1.1 M 硫酸銨中，且使其通過苯基瓊脂糖管柱，洗滌，並在 50 mM Tris

(pH 8.0) 中以 150 mM 與 300 mM 之間的硫酸銨進行溶離。對溶離液進行透析及過濾以供使用。

其他 GDF 阵 (經修飾以使活化素 A 結合比率相對於肌肉抑制素或 GDF11 降低之 ActRIIB-Fc 融合蛋白) 描述於 PCT/US2008/001506 及 WO 2006/012627 中，該等文獻以引用的方式併入本文中。

實施例 2. GDF-11 及活化素介導之發訊的生物檢定

使用 A-204 報導基因檢定來評估 ActRIIB-Fc 蛋白及 GDF 阵對藉由 GDF-11 及活化素 A 之發訊的影響。細胞系：人類橫紋肌肉瘤 (自肌肉而得)。報導載體：pGL3(CAGA)12 (描述於 Dennler 等人, 1998, EMBO 17:3091-3100 中)。CAGA12 基元存在於 TGF- β 反應基因 (PAI-1 基因) 中，故此載體一般用於經由 Smad2 及 Smad3 發訊之因子。

第 1 天：使 A-204 細胞分裂至 48 孔培養盤中。

第 2 天：以 10 μ g pGL3(CAGA)12 或 pGL3(CAGA)12(10 μ g) + pRLCMV (1 μ g) 及 Fugene 轉染 A-204 細胞。

第 3 天：添加因子 (於培養基 + 0.1% BSA 中稀釋)。抑制劑在添加至細胞中之前需與因子一起預培育 1 小時。6 小時後，以 PBS 沖洗細胞，且溶解細胞。

此步驟之後進行螢光素酶檢定。在不存在任何抑制劑下，活化素 A 顯示 10 倍刺激報導基因表現且 ED50 約 2 ng/ml。GDF-11：16 倍刺激，ED50：約 1.5 ng/ml。

在此檢定中，ActRIIB(20-134)為活化素、GDF-8 及

GDF-11 活性之有效抑制劑。在此檢定中亦測試變異體。

實施例 3. N 末端及 C 末端截斷對 GDF-11 之抑制

產生 N 末端及/或 C 末端截斷之 ActRIIB(20-134)-hFc 變異體，且測試其作為 GDF-11 及活化素抑制劑之活性。活性如下所示（如在條件培養基中所量測）：

C 末端 ActRIIB-hFc 截斷：

	IC ₅₀ (ng/mL)	
	GDF-11	活化素
ActRIIB(20-134)-hFc	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc	130	158

如此可見，在 C 末端截斷 3 個（以 ...PPT 終止）、6 個（以 ...YEP 中止）或超過 6 個胺基酸使分子活性下降三倍或超過三倍。ActRIIB 部分之最後 15 個胺基酸截斷使活性損失更大（參見 WO2006/012627）。

在 ActRIIB(20-131)-hFc 蛋白之背景中進行胺基末端截斷。活性如下所示（如在條件培養基中所量測）：

N 末端 ActRIIB-hFc 截斷：

	IC ₅₀ (ng/mL)	
	GDF-11	活化素
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100

ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105

因此，自 N 末端截斷 2 個、3 個或 4 個胺基酸得以產生比具有全長胞外域之型式更具活性的蛋白質。其他實驗顯示，截斷 5 個胺基酸，ActRIIB(25-131)-hFc 具有等效於未截斷形式之活性，且在 N 末端之其他缺失使蛋白質活性繼續降級。因此，最佳構築體將具有在 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 133-134 之間終止的 C 末端及在 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 22-24 之間起始的 N 末端。對應於胺基酸 21 或 25 之 N 末端將得到類似於 ActRIIB(20-134)-hFc 構築體之活性。此等截斷亦可用於 GDF 阵之情形中，諸如 L79D 或 L79E 變異體。

實施例 4. ActRIIB-Fc 變異體，基於細胞之活性

在基於細胞之檢定中測試 ActRIIB-Fc 蛋白及 GDF 阵之活性，如上所述。結果概述於下表中。一些變異體係以不同 C 末端截斷構築體形式進行測試。如上文所論述，截斷 5 個或 15 個胺基酸導致活性降低。GDF 阵 (L79D 及 L79E 變異體) 顯示活化素結合性有實質性損失，而幾乎保持野生型對 GDF-11 的抑制。

可溶性 ActRIIB-Fc 與 GDF11 及活化素 A 之結合性：

ActRIIB-Fc 變異	ActRIIB 部分 (對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸)	GDF11 抑制活性	活化素抑制活性
R64	20-134	+++ (約 10^{-8} M K_I)	+++ (約 10^{-8} M K_I)
A64	20-134	++ (約 10^{-6} M K_I)	++ (約 10^{-6} M K_I)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

+ 較差活性 (約 1×10^{-6} K_I)

++ 中等活性 (約 1×10^{-7} K_I)

+++ 良好 (野生型) 活性 (約 1×10^{-8} K_I)

++++ 高於野生型活性

已評估若干變異體在大鼠中之血清半生期。

ActRIIB(20-134)-Fc 具有約 70 小時之血清半生期。

ActRIIB(A24N 20-134)-Fc 具有約 100-150 小時之血清半生期。A24N 變異體在基於細胞之檢定 (上文) 及活體內檢定 (下文) 中具有等效於野生型分子的活性。與較長半生期相結合，此意謂 A24N 變異體之每個蛋白質單位隨時間將產生

大於野生型分子的作用。A24N 變異體及上文所測試之任何其他變異體（諸如 L79D 或 L79E 變異體）可與 GDF 邊分子組合。

實施例 5. GDF-11 及活化素 A 結合性

在 BiaCoreTM 檢定中，測試某些 ActRIIB-Fc 蛋白及 GDF 邊與配位體之結合性。

使用抗 hFc 抗體將 ActRIIB-Fc 變異體或野生型蛋白捕捉至系統上。注射配位體且使其流經所捕捉之受體蛋白。結果概述於下表中。

IIB 變異體之配位體結合特異性

GDF11			
蛋白質	Kon (1/Ms)	蛋白質	Kon (1/Ms)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5
GDF8			
蛋白質	Kon (1/Ms)	蛋白質	Kon (1/Ms)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc		ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5

ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5
	活化素 A		
蛋白質	Kon (1/Ms)	蛋白質	Kon (1/Ms)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc		ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc		ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6

此等數據展示基於細胞之檢定數據，其說明 A24N 變異體保持類似於 ActRIIB(20-134)-hFc 分子之配位體結合活性；且 L79D 或 L79E 分子保持肌肉抑制素及 GDF11 結合性，但顯示與活化素 A 之結合性顯著降低（不可定量）。

已產生其他變異體，且如 WO2006/012627（參見，例如第 59 至 60 頁；該文獻以全文引用的方式併入本文中）中所報導，使用與裝置偶合之配位體且使受體流經偶合之配位體來進行測試。值得注意的是，K74Y、K74F、K74I（及可能在 K74 處之其他疏水性取代，諸如 K74L）及 D80I 導

致活化素 A 結合性與 GDF11 結合性之比率相對於野生型 K74 分子降低。以下再現關於此等變異體之數據表：

可溶性 ActRIIB-Fc 變異體與 GDF11 及活化素 A 之結合性
(BiaCore 檢定)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15 尾	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* 未觀測到結合性

-- 小於 1/5 WT 之結合性

- 約 1/2 WT 之結合性
- + WT
- ++ 結合性增加小於 2 倍
- +++ 結合性增加約 5 倍
- ++++ 結合性增加約 10 倍
- +++++ 結合性增加約 40 倍

實施例 6. ActRIIB-hFc 在非人類靈長類動物中刺激紅血球生成

每週一次藉由皮下注射向雄性及雌性食蟹獮猴投予 ActRIIB(20-134)-hFc (IgG1)，歷時 1 個月。將 48 隻食蟹獮猴 (24 隻 / 性別) 分配至 4 個治療組中之一組 (6 隻動物 / 性別 / 組) 中，且每週一次經皮下注射投予 3 mg/kg、10 mg/kg 或 30 mg/kg 之媒劑或 ActRIIB-hFc，歷時 4 週 (總共 5 次劑量)。所評估之參數包括一般臨床病理學 (血液學、臨床化學、凝血及尿分析)。在經治療之動物中，截至第 15 天 ActRIIB-hFc 使平均絕對網狀紅血球值統計上顯著地升高。截至第 36 天，ActRIIB-hFc 引起若干血液學變化，包括平均絕對網狀紅血球值及紅血球分布寬度值升高及平均紅血球血紅素濃度下降。所有治療組及兩種性別皆受影響。此等影響與 ActRIIB-hFc 對未成熟網狀紅血球自骨髓釋放之正向影響一致。在經治療之動物洗除藥物之後 (截至研究第 56 天)，此影響逆轉。因此，吾人推斷 ActRIIB-hFc 刺激紅血球生成。

實施例 7. ActRIIB-mFc 在小鼠中藉由刺激脾紅血球生成活性而促進紅血球生成的方面

在本研究中，分析活體內投予 ActRIIB(20-134)-mFc 對骨髓及脾中造血祖細胞之頻率的影響。以 PBS 注射一組 C57BL/6 小鼠作為對照組，而向第二組小鼠投與兩次劑量之 10 mg/kg ActRIIB-mFc，且 8 天後兩組均處死。末梢血液用於進行全血液計數，且股骨及脾用於進行試管內成株檢定 (clonogenic assay) 以評估各器官中之淋巴祖細胞、紅血球祖細胞及骨髓祖細胞含量。在本研究之短暫時間範圍內，未觀察到經治療之小鼠的紅血球水平、血紅素水平或白血球水平有顯著變化。股骨中之有核細胞數目或祖細胞含量在對照組與治療組之間並無差異。在脾中，經化合物治療之組的每盤之成熟紅血球祖細胞 (CFU-E) 群落數目、頻率及每個脾之祖細胞總數統計上有顯著增加。此外，亦觀察到每個脾之骨髓祖細胞 (CFU-GM) 數目、未成熟紅血球祖細胞 (BFU-E) 數目及祖細胞總數增加。

動物：

本研究中使用 16 隻 6-8 週齡的 C57BL/6 雌性小鼠。在第 1 天及第 3 天向 8 隻小鼠經皮下注射 10 mg/kg 劑量的測試化合物 ActRIIB-mFc，且向 8 隻小鼠以每隻小鼠 100 μ L 之體積經皮下注射媒劑對照 - 磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS)。在第一次注射之後 8 天，根據相關動物照護準則 (Animal Care Guideline) 處死所有小鼠。藉由心臟穿刺術

收集個別動物之末梢血液 (PB) 樣本，且將其用於全血液計數與分類 (CBC/Diff)。自各小鼠收集股骨及脾。

所進行之測試：

CBC/Diff 計數

經由心臟穿刺術收集各小鼠之 PB，且將其置於適當微量採集管中。將樣本送至 CLV 以在 CellDyn 3500 計數器上進行分析。

成株檢定

使用下文所述之試管內基於甲基纖維素之培養基系統評估骨髓譜系、紅血球譜系及淋巴譜系之成株祖細胞。

成熟紅血球祖細胞：

在含有重組人類 (rh) 紅血球生成素 (3 U/mL) 的基於甲基纖維素之培養基 MethoCult™ 3334 中培養成熟紅血球 (CFU-E) 譜系之成株祖細胞。

淋巴祖細胞：

在含有 rh 介白素 7 (10 ng/mL) 的基於甲基纖維素之培養基 MethoCult® 3630 中培養淋巴 (CFU-pre-B) 譜系之成株祖細胞。

骨髓祖細胞及未成熟紅血球祖細胞：

在含有重組鼠類 (rm) 幹細胞因子 (50 ng/mL)、rh 介白素 6 (10 ng/mL)、rm 介白素 3 (10 ng/mL) 及 rh 紅血球生成素 (3 U/mL) 的基於甲基纖維素之培養基 MethoCult™ 3434 中培養顆粒球-單核球 (CFU-GM) 譜系、紅血球 (BFU-E) 譜系及多潛能 (CFU-GEMM) 譜系之成株祖細胞。

方法：

以標準方案處理小鼠股骨及脾。簡言之，藉由使用 21 號針及 1 cc 注射器以含有 2% 胎牛血清之依斯科夫改良達爾伯克培養基 (Iscove's Modified Dulbecco's Media) (IMDM 2% FBS) 沖洗股骨腔來獲得骨髓。藉由經 70 μM 過濾器粉碎脾且以 IMDM 2% FBS 沖洗過濾器來獲得脾細胞。接著，使用牛鮑氏計數池 (Neubauer counting chamber) 對單一細胞懸浮液進行 3% 冰醋酸中之有核細胞計數，以便可計算每個器官之全部細胞。為移除污染之紅血球，接著以 3 倍體積之氯化銨溶解緩衝液稀釋全部脾細胞，且在冰上培育 10 分鐘。接著洗滌該等細胞且將其再懸浮於 IMDM 2% FBS 中，且進行第二次細胞計數以確定細胞溶解後之細胞濃度。

製造細胞儲備液，且將其添加至各基於甲基纖維素之培養基調配物中，以在各培養基調配物中獲得各組織的最佳塗佈濃度。將骨髓細胞以 1×10^5 個細胞/盤塗於 MethoCult™ 3334 中以評估成熟紅血球祖細胞，以 2×10^5 個細胞/盤塗於 MethoCult™ 3630 中以評估淋巴祖細胞，且以 3×10^4 個細胞/盤塗於 MethoCult™ 3434 中以評估未成熟紅血球祖細胞及骨髓祖細胞。將脾細胞以 4×10^5 個細胞/盤塗於 MethoCult™ 3334 中以評估成熟紅血球祖細胞，以 4×10^5 個細胞/盤塗於 MethoCult™ 3630 中以評估淋巴祖細胞，且以 2×10^5 個細胞/盤塗於 MethoCult™ 3434 中以評估未成熟紅血球祖細胞及骨髓祖細胞。在 37°C 下、5% CO₂ 中培育以一式三份塗於盤中之培養物，直至經培訓人員進

行群落計數及評估為止。將成熟紅血球祖細胞培養 2 天，
淋巴祖細胞培養 7 天，且成熟紅血球祖細胞及骨髓祖細胞
培養 12 天。

分析：

對於成株檢定之一式三份培養物且對於對照組與治療組之所有數據集來計算平均值 +/- 1 個標準差。

各組織中群落形成細胞 (CFC) 之頻率計算如下：

每盤所塗佈之細胞

每盤所計之平均 CFC

每個股骨或脾之總 CFC 計算如下：

所計之總 CFC × 每個股骨或脾之有核細胞計數 (在 RBC 溶解之後)

經培養之有核細胞數目

進行標準 t-測試以評估細胞或造血祖細胞之平均數目在 PBS 對照組小鼠與經化合物治療之小鼠之間是否存在差異。由於群落計數潛在地存在主觀性，故認為 p 值小於 0.01 即具顯著性。各組之平均值 (+/- SD) 展示於下表中。

表：血液學參數

治療組	白血球 ($\times 10^9/L$)	紅血球 ($\times 10^9/L$)	血紅素 (g/L)	血容比 (L/L)
PBS (n=8)	9.53 +/- 1.44	10.5 +/- 1.1	160.9 +/- 13.3	0.552 +/- 0.057
ActRIIB-mFc (n=8)	9.77 +/- 1.19	10.8 +/- 0.3	162.1 +/- 4.1	0.567 +/- 0.019

表：來自股骨及脾之 CFC

治療組	總 CFC/股骨	總 CFC/脾	總 CFU-E/股骨	總 CFU-E/脾
PBS (n=8)	88 +/- 10	54 +/- 14	156 +/- 27	131 +/- 71
ActRIIB-mFc (n=8)	85 +/- 9	79 +/- 6*	164 +/- 23	436 +/- 86*

*初步分析表明 $p < 0.05$

在本研究之短暫時間範圍內，用 ActRIIB(20-134)-mFc 治療小鼠未使紅血球或血紅素含量顯著增加。然而，對祖細胞含量影響顯著。股骨中之有核細胞數目或祖細胞含量在對照組與治療組之間並無差異。在脾中，經化合物治療之組在紅血球溶解之前有核細胞數目及每盤之成熟紅血球祖細胞 (CFU-E) 群落數目、頻率及每個脾之祖細胞總數統計上有顯著增加。此外，觀察到每個脾之骨髓祖細胞 (CFU-GM) 數目、未成熟紅血球祖細胞 (BFU-E) 數目及祖細胞總數增加。因此預期，經較長時程，ActRIIB(20-134)-mFc 治療可使紅血球及血紅素含量升高。

實施例 8：GDF 饋增加活體內紅血球水平

將 12 週齡之雄性 C57BL/6NTac 小鼠分配至兩個治療組中之一組 ($N = 10$) 中。每週兩次藉由皮下注射 (SC) 向小鼠給予 10 mg/kg 之媒劑或變異體 ActRIIB 多肽 (「GDF 饋」) [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]，歷時 4 週。研究終止時，藉由心臟穿刺術將全血收集至含 EDTA 之管中，且使用 HM2 血液分析儀 (Abaxis 公司) 分析細胞分布。

組別標號

組	N	小鼠	注射	劑量 (mg/kg)	途徑	頻率
1	10	C57BL/6	PBS	0	SC	2 次/週
2	10	C57BL/6	GDF 阈 [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]	10	SC	2 次/週

用 GDF 阈治療與媒劑對照組相比對白血球 (WBC) 數目無統計上顯著的影響。治療組中紅血球 (RBC) 之數目相對於對照組增加 (見下表)。血紅素含量 (HGB) 與血容比 (HCT) 亦因額外紅血球而增加。紅血球之平均寬度 (RDWc) 在經治療之動物中較高，表明未成熟紅血球庫增加。因此，用 GDF 阈治療使紅血球增加，而對白血球群體並無可辨別之影響。

血液學結果

	RBC ($10^{12}/L$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10.7 ± 0.1	14.8 ± 0.6	44.8 ± 0.4	17.0 ± 0.1
GDF 阈	$12.4 \pm 0.4^{**}$	$17.0 \pm 0.7^*$	$48.8 \pm 1.8^*$	$18.4 \pm 0.2^{**}$

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$

實施例 9：GDF 阈在增加活體內紅血球水平方面優於 ActRIIB-Fc

將 19 週齡之雄性 C57BL/6NTac 小鼠隨機分配至三個治療組中之一組中。每週兩次藉由皮下注射向小鼠給予媒劑 (10 mM Tris 緩衝生理食鹽水，TBS)、野生型 ActRIIB(20-134)-mFc 或 GDF 阈 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc，歷時 3 週。在基線處及給藥 3 週後藉由面頰

放血收集血液，且使用血液分析儀（HM2，Abaxis 公司）分析細胞分布。

用 ActRIIB-Fc 或 GDF 阵治療與媒劑對照組相比對白血球（WBC）數目無顯著影響。與對照組或野生型構築體相比，經 GDF 阵治療之小鼠中紅血球計數（RBC）、血容比（HCT）及血紅素水平皆升高（見下表）。因此，在直接比較時，與野生型 ActRIIB-Fc 蛋白相比，GDF 阵促使紅血球增加之程度顯著較高。實際上，在本實驗中，野生型 ActRIIB-Fc 蛋白未使紅血球統計上顯著地增加，表明將需要更長時間給藥或更高劑量以顯現出此效果。

給藥 3 週後的血液學結果

	RBC ($10^{12}/\text{ml}$)	HCT (%)	HGB (g/dL)
TBS	11.06 ± 0.46	46.78 ± 1.9	15.7 ± 0.7
ActRIIB-mFc	11.64 ± 0.09	49.03 ± 0.3	16.5 ± 1.5
GDF 阵	$13.19 \pm 0.2^{**}$	$53.04 \pm 0.8^{**}$	$18.4 \pm 0.3^{**}$

** = $p < 0.01$

實施例 10. 產生具有經截斷之 ActRIIB 胞外域的 GDF 阵

如實施例 1 中所述，藉由使 TPA 前導序列與含有天門冬胺酸取代白胺酸（在 SEQ ID NO: 1 之殘基 79 處）之 ActRIIB 胞外域（SEQ ID NO: 1 中之殘基 20-134）進行 N 末端融合且以最小連接子（3 個甘胺酸殘基）與人類 Fc 域進行 C 末端融合來產生 GDF 阵，稱為 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc（圖 3）。對應於此融合蛋白之核苷酸序列展示於圖 4 中。

藉由使 TPA 前導序列與含有天門冬胺酸取代白胺酸（在 SEQ ID NO: 1 之殘基 79 處）之經截斷胞外域（SEQ ID NO: 1 中之殘基 25-131）進行 N 末端融合且以最小連接子（3 個甘胺酸殘基）與人類 Fc 域進行 C 末端融合來產生具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 阵，稱為 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc（圖 5）。對應於此融合蛋白之核苷酸序列展示於圖 6 中。

實施例 11. 具有經雙截斷之 ActRIIB 胞外域之 GDF 阵的選擇性配位體結合性

在試管內用 BiacoreTM 儀器評估 GDF 阵及其他 ActRIIB-hFc 蛋白對若干配位體之親和力。結果概述於下表中。由於複合物之締合及解離極為迅速，使得無法精確測定 k_{on} 及 k_{off} ，故藉由穩態親和力擬合來獲得 K_d 值。

ActRIIB-hFc 變異體之配位體選擇性：

融合構築體	活化素 A (K_d e-11)	活化素 B (K_d e-11)	GDF11 (K_d e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350.0	78.8	12.3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290.0	62.1	7.4

具有經截斷胞外域之 GDF 阵 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 具有等於或超過較長變異體 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 所展現之配位體選擇性，且與缺乏 L79D 取代之 ActRIIB-hFc 對應物相比，其活化素 A 結合性及活化素 B 結合性之損失顯著，而幾乎完全保留 GDF11 結合性。應注

意，單獨截斷（無 L79D 取代）並不改變對此處所展現之配位體的選擇性[將 ActRIIB(L79 25-131)-hFc 與 ActRIIB(L79 20-134)-hFc 相比較]。

實施例 12. 產生具有替代性核苷酸序列之 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc

為產生 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc，使在原生序列位置 79 (SEQ ID NO: 1) 具有天門冬胺酸取代且具有 N 末端及 C 末端截斷 (SEQ ID NO: 1 中之殘基 25-131) 的人類 ActRIIB 胞外域與 TPA 前導序列而非原生 ActRIIB 前導序列在 N 末端融合且經由最小連接子 (3 個甘胺酸殘基) 與人類 Fc 域在 C 末端融合 (圖 5)。編碼此融合蛋白之一個核苷酸序列展示於圖 6 中 (SEQ ID NO: 27)，且精確編碼相同融合蛋白之替代性核苷酸序列展示於圖 9 中 (SEQ ID NO: 30)。此蛋白係使用實施例 1 中所述之方法進行表現及純化。

實施例 13. 具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 隊在小鼠中增加紅血球祖細胞增殖

評估 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 以確定其對紅血球祖細胞增殖的影響。在第 1 天及第 4 天以 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg，經皮下；n = 6) 或媒劑 (TBS；n = 6) 治療雄性 C57BL/6 小鼠 (8 週齡)，接著在第 8 天施以無痛致死術以收集脾、腔骨、股骨及血液。分離脾及骨髓之細胞，在含有 5% 胎牛血清之依斯科夫改良達爾伯克培養基

中稀釋，懸浮於專用的基於甲基纖維素之培養基中，且培養 2 天或 12 天以分別在紅血球群落形成單位 (CFU-E) 階段及紅血球爆式形成單位 (BFU-E) 階段評估成株祖細胞之水平。用於 BFU-E 測定的基於甲基纖維素之培養基 (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) 包括重組鼠類幹細胞因子、介白素-3 及介白素-6，該三者並不存在於用於 CFU-E 測定之甲基纖維素培養基 (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies) 中，但兩種培養基均含有紅血球生成素以及其他成份。對於 BFU-E 與 CFU-E，群落數目係在來源於各組織樣本之雙份培養盤中測定，且結果之統計分析係基於每個治療組之小鼠數目。

用 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 處理的來源於小鼠之脾的培養物具有對照組小鼠之相應培養物兩倍的 CFU-E 群落數目 ($P<0.05$)，而 BFU-E 群落數目在活體內治療下並無顯著差異。骨髓培養物之 CFU-E 或 BFU-E 群落數目在治療下亦無顯著差異。如所預期，與對照組相比，對經 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 治療之小鼠施以無痛致死術時，來源於脾之培養物中 CFU-E 群落數目增加伴隨有紅血球水平 (增加 11.6%)、血紅素濃度 (增加 12%) 及血容比水平 (增加 11.6%) 極其顯著地 ($P<0.001$) 變化。此等結果表明，活體內投予具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 隣可刺激紅血球祖細胞增殖 (作為其總體作用之一部分) 以增加紅血球水平。

實施例 14. 具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 片在小鼠中抵消 (offset) 化療誘發之貧血

申請者在基於太平洋紫杉醇之化療誘發之貧血的小鼠模型中研究 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 對紅血球生成參數的影響，太平洋紫杉醇係藉由阻斷微管聚合而抑制細胞分裂。將雄性 C57BL/6 小鼠 (8 週齡) 分配至 4 個治療組中之一組中：

- 1) 太平洋紫杉醇 (25 mg/kg, 腹膜內)；
- 2) ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, 腹膜內)；
- 3) 太平洋紫杉醇 + ActRIIB(L79D 25-131)-hFc；
- 4) 媒劑 (TBS)。

在第 0 天投予太平洋紫杉醇，而在第 0 天及第 3 天投予 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 或媒劑。在第 1 天、第 3 天及第 5 天自獨立群組收集血液樣本以供 CBC 分析，且治療組 1 至 3 (上述) 之結果以在指定時間點與媒劑之差異百分比表示。太平洋紫杉醇毒性所致之損耗為在第 3 天僅有太平洋紫杉醇之群組的結果 (其中 $n = 1$)；否則，各治療組在各時間點 $n = 3-5$ 。與媒劑相比，單獨太平洋紫杉醇在第 5 天使血紅素濃度下降接近 13%，而添加 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 阻止此太平洋紫杉醇誘導之下降 (圖 11)。對於血容比及 RBC 水平，觀測到類似效果。在不存在太平洋紫杉醇的情況下，與媒劑相比，ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 在第 3 天及第 5 天使血紅素濃度增加 10% (圖 11)。因此，具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 片可充分增加紅血球水

平以抵消化療誘發之貧血。

實施例 15. 具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 阵在小鼠中逆轉腎切除誘發之貧血

申請者研究 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 對慢性腎病之腎切除小鼠模型之貧血的影響。對雄性 C57BL/6 小鼠（11 週齡）進行假手術或單側腎切除術以降低紅血球生成素產生能力。允許小鼠在手術後恢復一週，且接著每週兩次以 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, 腹膜內；n = 15/病狀) 或媒劑 (TBS；n = 15/病狀) 進行治療，歷時總共 4 週。在開始給藥之前及治療 4 週之後收集血液樣本。經媒劑治療之腎切除小鼠經 4 週治療時段展現紅血球數目顯著下降，而以 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 治療不僅阻止下降，而且使紅血球水平增至高於基線 17% (P<0.001) (圖 12)，儘管腎之紅血球生成素產生能力降低。在腎切除小鼠中，ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 亦使血紅素濃度及血容比水平自基線顯著增加，且值得注意的是，其刺激在腎切除條件下此等紅血球生成參數中之每一者達到與假手術條件下大致相同之程度 (圖 13)。因此，具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 阵可充分增加紅血球水平以逆轉慢性腎病模型之貧血。

實施例 16. 具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 阵在大鼠中改善失血誘發之貧血的恢復

申請者在急性失血誘發之貧血（急性出血後貧血）之大鼠模型中研究 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 對紅血球生成參數的影響。雄性史泊格多利大鼠（Sprague-Dawley rat）（約 300 g）在供應商（Harlan）處接受長期頸靜脈導管。在第 -1 天，在異氟烷麻醉下經由該導管經 5 分鐘時段自各大鼠抽取總血液體積之 20%。對於體重大於 120 g 之大鼠，所取出之血液體積係基於依照 Lee 及合作者所得之以下關係（J Nucl Med 25:72-76, 1985）計算的總血液體積值：

$$\text{總血液體積 (ml)} = 0.062 \times \text{體重 (g)} + 0.0012$$

在取出血液時，經由導管替換等體積之磷酸鹽緩衝生理食鹽水。在第 0 天及第 3 天用 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, 經皮下; n = 5) 或媒劑 (TBS; n = 5) 治療大鼠。在第 -1 天（基線）、第 0 天、第 2 天、第 4 天及第 6 天經由導管取出血液樣本以供 CBC 分析。

截至第 0 天，對照組大鼠對失血 20% 起反應，紅血球水平下降接近 15%。在第 2 天及第 4 天此等水平仍顯著低於基線，且截至第 6 天仍未完全康復（圖 14）。儘管以 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 治療之大鼠在失血 20% 之後紅血球水平幾乎相同地下降，但接著，截至第 2 天此等大鼠即在該等水平方面展現完全恢復，接著在第 4 天及第 6 天進一步升高，此現象表示在相應時間點與對照組水平相比有極其顯著的改善（圖 14）。對於血紅素濃度，獲得類似結果。此等發現說明，具有經截斷 ActRIIB 胞外域之 GDF 阵可使紅血球水平自急性失血所致之貧血較快速地恢復。

實施例 17. 具有經截斷之 ActRIIB 胞外域的 GDF 阵在非人類靈長類動物中增加紅血球水平

評估兩種 GDF 阵 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 及 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 刺激食蟹獮猴中紅血球產生的能力。在第 1 天及第 8 天以 GDF 阵 (10 mg/kg; n = 4 隻雄性/4 隻雌性) 或媒劑 (n = 2 隻雄性/2 隻雌性) 經皮下治療猴子。在第 1 天 (治療前基線)、第 3 天、第 8 天、第 15 天、第 29 天及第 44 天收集血液樣本，且分析紅血球水平 (圖 15)、血容比 (圖 16)、血紅素水平 (圖 17) 及網狀紅血球水平 (圖 18)。經媒劑治療之猴子在所有治療後時間點皆展現紅血球水平、血容比水平及血紅素水平降低，此為重複採血之預期效果。相比之下，截至第一個治療後時間點 (第 3 天)，以 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 或 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 治療使此等參數增加，且在本研究期間將其維持在實質上較高之水平下 (圖 15 至圖 17)。重要的是，與媒劑相比，以 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 或 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 治療之猴子的網狀紅血球水平在第 8 天、第 15 天及第 29 天實質上增加 (圖 18)。此結果說明 GDF 阵治療增加紅血球前驅體產生，從而使紅血球水平升高。

綜合考量，此等數據說明經截斷之 GDF 阵以及全長變異體可用作 GDF11 及潛在相關配位體的選擇性拮抗劑，以增加活體內紅血球形成。

血的小鼠模型中對血紅素濃度的影響。數據為平均值 \pm SEM。**， $P<0.01$ ，與在相同時間點的太平洋紫杉醇相比。此 GDF 阵抵銷太平洋紫杉醇治療所誘發之貧血。

圖 12 展示 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 在慢性腎病之單側腎切除 (NEPHX) 小鼠模型中對紅血球 (RBC) 水平的影響。數據為平均值 \pm SEM。***， $P<0.001$ ，與基線相比。此 GDF 阵逆轉在對照組小鼠中所觀測之腎切除誘發之貧血。

圖 13 展示 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 在慢性腎病之單側腎切除 (NEPHX) 小鼠模型中對紅血球 (RBC) 水平、血紅素 (HGB) 水平及血容比 (HCT) 水平的影響。數據為經 4 週自基線之平均變化 (\pm SEM)。*， $P<0.05$ ；**， $P<0.01$ ；***， $P<0.001$ ，與 NEPHX 對照組相比。此 GDF 阵預防此等紅血球參數與腎切除相關地下降，使各參數增至與腎完整 (假手術) 小鼠類似之數量級。

圖 14 展示 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 在急性失血誘發之貧血的大鼠模型中對紅血球 (RBC) 水平的影響。在第 1 天進行取血，在第 0 天及第 3 天給藥。數據為平均值 \pm SEM。**， $P<0.01$ ；***， $P<0.001$ ，與在相同時間點的媒劑相比。此 GDF 阵改善失血誘發之貧血的恢復速度及程度。

圖 15 展示在食蟹獮猴中用 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (灰色) 或 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (黑色) 治療對紅血球濃度自基線之絕對變化的影響。VEH = 媒劑。數據為平均值 \pm SEM。n = 4-8 隻/組。

圖 16 展示在食蟹獮猴中用 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (灰色) 或 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (黑色) 治療對血容比自基線之絕對變化的影響。VEH = 媒劑。數據為平均值 \pm SEM。n = 4-8 隻/組。

圖 17 展示在食蟹獮猴中用 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (灰色) 或 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (黑色) 治療對血紅素濃度自基線之絕對變化的影響。VEH = 媒劑。數據為平均值 \pm SEM。n = 4-8 隻/組。

圖 18 展示在食蟹獮猴中用 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (灰色) 或 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (黑色) 治療對循環網狀紅血球濃度自基線之絕對變化的影響。VEH = 媒劑。數據為平均值 \pm SEM。n = 4-8 隻/組。

【主要元件符號說明】

無

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98127213

A61K 38/16

(2006.01)

※申請日：98.8.13

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 7/00

(2006.01)

使用 GDF 阻以增加紅血球水平

USE OF GDF TRAPS TO INCREASE RED BLOOD
CELL LEVELS

二、中文發明摘要：

在某些方面中，本發明提供在脊椎動物（包括齧齒動物及靈長類動物，且尤其人類）中增加紅血球及/或血紅素水平的組成物及方法。

三、英文發明摘要：

In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for increasing red blood cell and/or hemoglobin levels in vertebrates, including rodents and primates, and particularly in humans.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

1981014修改
第1頁

六、發明說明：

相關申請案

本申請案主張 2008 年 8 月 14 日申請之美國臨時申請案第 61/189,094 號之權利。上述申請案之所有教示皆以引用的方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於在脊椎動物中增加紅血球及/或血紅素水平的組成物及方法。

【先前技術】

成熟紅血球負責脊椎動物循環系統中之氧運輸。紅血球載運高濃度之血紅素，一種在氧分壓 (pO_2) 相對高的肺中結合氧且將氧遞送至 pO_2 相對低的身體區域之蛋白質。

成熟紅血球係在稱為紅血球生成之過程中由分化多能性造血幹細胞產生。產後紅血球生成主要在骨髓及脾紅髓中發生。各種發訊路徑之協同作用控制細胞增殖、分化、存活及死亡之平衡。在正常條件下，紅血球係以維持體內紅血球質量恆定之速率產生，且產量可回應各種刺激（包括氧張力或組織需求增加或減少）而增加或減少。紅血球生成過程起始於譜系定型前驅細胞（lineage committed precursor cell）形成，且經由一系列相異的前驅細胞類型向前發展。紅血球生成之最後階段進行時，網狀紅血球釋放至血流中且失去其粒線體及核糖體，同時呈現成熟紅血球之形態。血液中網狀紅血球水平升高或網狀紅血球:紅血球比率升高表明紅血球產生速率增加。

紅血球生成素 (Epo) 被廣泛視為產後脊椎動物中最重要的紅血球生成正調節子。Epo 調節對低組織氧張力 (缺氧) 及低紅血球水平或低血紅素水平之代償性紅血球生成反應。在人類中，高 Epo 水平係藉由刺激骨髓及脾中紅血球系祖細胞產生而促進紅血球形成。在小鼠中，Epo 主要增強脾中紅血球生成。

醫師使用各種形式之重組 Epo 在多種臨床環境中增加紅血球水平，且尤其用於治療貧血。貧血為廣義定義之病狀，其特徵在於血液中血紅素或紅血球低於正常水平。在一些情況下，貧血係由紅血球產生或存活方面的原發性病症引起。更普遍的是，貧血為其他系統之疾病的繼發性疾患 (Weatherall 及 Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175)。貧血可因紅血球產生速率降低或破壞速率增加引起，或因出血所致之紅血球損失而引起。貧血可由多種病症引起，該等病症包括例如慢性腎衰竭、化療治療、脊髓發育不良症候群、類風濕性關節炎及骨髓移植。

典型地，用 Epo 治療導致健康人類之血紅素經數週上升約 1-3 g/dL。當投予貧血個體時，此治療攝生法通常使血紅素及紅血球水平得以實質性增加，且使生活品質改善並延長存活。Epo 並非一律有效，且許多個體即使以高劑量仍難以治癒 (Horl 等人 (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50)。超過 50% 之癌症患者對 Epo 反應不足，約 10% 之晚期腎病患者反應較低 (Glaspy 等人 (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234；Demetri 等人 (1998) J Clin Oncol 16,

生期的變異體。舉例而言，經改變之蛋白質可對蛋白降解或導致未經修飾之 GDF 隅多肽破壞或以其他方式失活的其他過程變得更穩定或更不穩定。該等變異體及編碼其之基因可用於藉由調節 GDF 隅多肽之半生期而改變 GDF 隅多肽水平。舉例而言，短半生期可產生更短暫的生物效應，且當該等變異體為誘導性表現系統之一部分時，其可允許更嚴格地控制細胞內重組 GDF 隅多肽水平。在 Fc 融合蛋白中，突變可在連接子（若有）及/或 Fc 部分中進行以改變該蛋白之半生期。

在某些具體實例中，除 ActRIIB 多肽中天然存在之任何修飾以外，本發明之 GDF 隅多肽可進一步包含轉譯後修飾。該等修飾包括（但不限於）乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂質化及醯化。因此，GDF 隅多肽可含有非胺基酸元件，諸如聚乙二醇、脂質、多醣或單醣及磷酸酯。可如本文中針對其他 GDF 隅多肽變異體所述來測試該等非胺基酸元件對 GDF 隅多肽之功能性的影響。當在細胞中藉由使初生形式之 GDF 隅多肽裂解而產生 GDF 隅多肽時，轉譯後處理對蛋白質之正確摺疊及/或功能而言亦重要。不同細胞（諸如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293）針對該等轉譯後活性具有特異性細胞機構及特徵機制，且可經選擇以確保 GDF 隅多肽之正確修飾及處理。

在某些方面中，GDF 隅多肽包括具有至少一部分 ActRIIB 多肽及一或多個融合域的融合蛋白。該等融合域之熟知實例包括（但不限於）聚組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽

S 轉移酶 (GST)、硫氧還蛋白 (thioredoxin)、蛋白質 A、蛋白質 G、免疫球蛋白重鏈恆定區 (例如 Fc)、麥芽糖結合蛋白 (MBP) 或人血清白蛋白。可選擇融合域以賦予所要性質。舉例而言，一些融合域尤其適用於藉由親和層析來分離融合蛋白。出於親和純化之目的，使用供親和層析用之相關基質，諸如麩胱甘肽結合樹脂、澱粉酶結合樹脂及鎳結合樹脂或鈷結合樹脂。許多該等基質可以「套組 (kit)」形式利用，諸如適於與(HIS₆) (SEQ ID NO: 24) 融合搭配物一起使用之 Pharmacia GST 純化系統及 QIAexpressTM 系統 (Qiagen)。作為另一實例，可選擇融合域以有利於偵測 GDF 隅多肽。該等偵測域之實例包括各種螢光蛋白 (例如 GFP) 以及「抗原決定基標籤 (epitope tag)」，該等抗原決定基標籤通常為特異性抗體可利用之短肽序列。特異性單株抗體可易於利用之熟知抗原決定基標籤包括 FLAG、流感病毒紅血球凝集素 (haemagglutinin, HA) 及 c-myc 標籤。在一些狀況下，融合域具有蛋白酶裂解位點 (諸如因子 Xa 或凝血酶之裂解位點)，其允許相關蛋白酶部分地消化融合蛋白且從而自其釋放重組蛋白。接著，可藉由後續層析分離自融合域中分離出所釋放之蛋白。在某些較佳具體實例中，GDF 隅多肽與在活體內穩定 GDF 隅多肽之域 (「穩定子」域) 融合。「穩定」意謂增加血清半生期之任何舉措，無論此係由於破壞減少、腎清除率降低抑或其他藥物動力學作用。已知與免疫球蛋白之 Fc 部分融合賦予眾多蛋白質所需的藥物動力學性質。與人血清白蛋白融合同樣可賦予

所需性質。可選擇之其他類型之融合域，包括多聚（例如二聚、四聚）域及功能域（其賦予額外生物功能，諸如進一步增加紅血球水平）。

作為一特定實例，本發明提供作為 ActRIIB-Fc 融合蛋白之 GDF 駛，其包含與 Fc 域融合之 ActRIIB 多肽胞外域（例如配位體結合域）。例示性 Fc 域之序列如下所示（SEQ ID NO:6）：

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDD(A)VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN~~A~~TKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*。

視情況，Fc 域在諸如 Asp-265、離胺酸 322 及 Asn-434 之殘基處具有一或多個突變。在某些狀況下，具有一或多個此等突變（例如 Asp-265 突變）之突變 Fc 域與 Fc γ 受體結合之能力相對於野生型 Fc 域降低。在其他狀況下，具有一或多個此等突變（例如 Asn-434 突變）之突變 Fc 域與 I 類 MHC 相關 Fc 受體（FcRN）結合之能力相對於野生型 Fc 域增加。

應瞭解，可以與所要功能性一致的任何方式配置融合蛋白之不同元件。舉例而言，GDF 駛多肽可置於異源域之 C 末端，或者，異源域可置於 GDF 駛多肽之 C 末端。在融合蛋白中 GDF 駛多肽域與異源域無需相鄰，且該等域中之任

一域的 C 末端或 N 末端處或該等域之間可包括其他域或胺基酸序列。

在某些具體實例中，GDF 鮮融合蛋白包含式 A-B-C 所示之胺基酸序列。B 部分為由對應於 SEQ ID NO: 26 之胺基酸 26-132 之胺基酸序列所組成的 N 末端及 C 末端截斷之 ActRIIB 多肽。A 部分及 C 部分可獨立地為零個、一個或超過一個胺基酸，且 A 部分與 C 部分（若存在）均與 B 異源。A 及/或 C 部分可經由連接子序列與 B 部分連接。例示性連接子包括短多肽連接子，諸如 2-10 個、2-5 個、2-4 個、2-3 個甘胺酸殘基，諸如 Gly-Gly-Gly 連接子。上文描述其他適宜之連接子。在某些具體實例中，GDF 鮮融合蛋白包含式 A-B-C 所示之胺基酸序列，其中 A 為前導序列，B 由 SEQ ID NO: 26 之胺基酸 26-132 所組成，且 C 為增強活體內穩定性、活體內半生期、攝取/投予、組織定位或分布、蛋白質複合物之形成及/或純化中之一或多者的多肽部分。在某些具體實例中，GDF 鮮融合蛋白包含式 A-B-C 所示之胺基酸序列，其中 A 為 TPA 前導序列，B 由 SEQ ID NO: 26 之胺基酸 26-132 所組成，且 C 為免疫球蛋白 Fc 域。較佳之 GDF 鮮融合蛋白包含 SEQ ID NO: 26 所示之胺基酸序列。

在某些具體實例中，本發明之 GDF 鮮多肽含有一或多個能夠穩定 GDF 鮮多肽之修飾。舉例而言，該等修飾增加 GDF 鮮多肽之試管內半生期，增加 GDF 鮮多肽之循環半生期，或減少 GDF 鮮多肽之蛋白降解。該等穩定化修飾包括（但不限於）融合蛋白（包括例如包含 GDF 鮮多肽及穩定子

實施例 18. 源自 ActRIIB5 之 GDF 片

他人已報導 ActRIIB 之替代性可溶性形式（稱為 ActRIIB5），其中包括 ActRIIB 跨膜域之表現子（exon）4 已由不同 C 末端序列置換（WO2007/053775）。

無前導序列之原生人類 ActRIIB5 之序列如下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR
LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTTIPSGGPE
ATAAAAGDQGSGALWLCLGPAHE (SEQ ID NO: 36)。

在原生序列位置 79（加底線並突出顯示）處可進行所述天門冬氨酸取代白胺酸或其他酸性取代，以構築變異體 ActRIIB5(L79D)，其具有以下序列：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH
CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTTIPSGGPEAT
AAAGDQGSGALWLCLGPAHE (SEQ ID NO: 37)。

此變異體可經由 TGGG (SEQ ID NO: 42) 連接子與人類 Fc 連接，以產生具有以下序列之人類 ActRIIB5(L79D)-hFc 融合蛋白：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH
CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTTIPSGGPEAT
AAAGDQGSGALWLCLGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY

98年10月19日修正替換頁

VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)。

此構築體可在 CHO 細胞中表現。

以引用方式併入

本文所提及之所有公開案及專利皆以全文引用的方式併入本文中，如同特定且個別地指明將各個別公開案或專利以引用的方式併入一般。

雖然已論述本發明之特定具體實例，但上述說明為說明性而非限制性的。熟習此項技術者在回顧本說明書及以下申請專利範圍後，許多變化將變得顯而易見。應藉由參考申請專利範圍及其等效物之完整範疇及本說明書以及該等變化來確定本發明之完整範疇。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示具有本文所推斷之殘基的人類 ActRIIA (SEQ ID NO: 15) 與人類 ActRIIB (SEQ ID NO: 2) 之胞外域的排比，該排比係基於針對以方框表示之直接接觸配位體 (配位體結合阱) 的多個 ActRIIB 及 ActRIIA 晶體結構的複合分析。

圖 2 展示各種脊椎動物 ActRIIB 蛋白與人類 ActRIIA

(SEQ ID NO: 16-23) 之多個序列排比。

圖 3 展示 GDF 阵 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 43) 之完全胺基酸序列，包括 TPA 前導序列（加雙底線）、ActRIIB 胞外域 (SEQ ID NO: 1 中之殘基 20-134；加底線)、及 hFc 域。在原生序列之位置 79 取代之天門冬胺酸加雙底線並突出顯示，而藉由定序顯示為成熟融合蛋白之 N 末端殘基之甘胺酸亦加雙底線並突出顯示。

圖 4 展示編碼 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 之核苷酸序列。SEQ ID NO: 25 對應於意義鏈，而 SEQ ID NO:33 對應於反義鏈。TPA 前導序列(核苷酸 1-66)加雙底線，且 ActRIIB 胞外域 (核苷酸 76-420) 加底線。

圖 5 展示經截斷之 GDF 阵 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 26)，包括 TPA 前導序列 (加雙底線)、經截斷之 ActRIIB 胞外域 (SEQ ID NO: 1 中之殘基 25-131；加底線)、及 hFc 域。在原生序列之位置 79 取代之天門冬胺酸加雙底線並突出顯示，而藉由定序顯示為成熟融合蛋白之 N 末端殘基之麩胺酸亦加雙底線並突出顯示。

圖 6 展示編碼 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 之核苷酸序列。SEQ ID NO: 27 對應於意義鏈，且 SEQ ID NO:34 對應於反義鏈。TPA 前導序列 (核苷酸 1-66) 加雙底線，且經截斷之 ActRIIB 胞外域 (核苷酸 76-396) 加底線。亦展示 ActRIIB 胞外域 (SEQ ID NO: 44) 的胺基酸序列。

圖 7 展示無前導序列之經截斷 GDF 阵 ActRIIB(L79D

25-131)-hFc 的胺基酸序列 (SEQ ID NO: 28)。經截斷之 ActRIIB 胞外域 (SEQ ID NO: 1 中之殘基 25-131) 加底線。在原生序列之位置 79 取代之天門冬胺酸加雙底線並突出顯示，而藉由定序顯示為成熟融合蛋白之 N 末端殘基之麩胺酸亦加雙底線並突出顯示。

圖 8 展示無前導序列、hFc 域、及連接子之經截斷 GDF 附 ActRIIB(L79D 25-131)的胺基酸序列 (SEQ ID NO: 29)。在原生序列之位置 79 取代之天門冬胺酸加底線並突出顯示，而藉由定序顯示為成熟融合蛋白之 N 末端殘基之麩胺酸亦加雙底線並突出顯示。

圖 9 展示編碼 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 之替代性核苷酸序列。SEQ ID NO: 30 對應於意義鏈，且 SEQ ID NO: 35 對應於反義鏈。TPA 前導序列 (核苷酸 1-66) 加雙底線，經截斷之 ActRIIB 胞外域 (核苷酸 76-396) 加底線，且在胞外域之野生型核苷酸序列的取代加雙底線並突出顯示 (與圖 6 之 SEQ ID NO: 27 相比)。亦展示 ActRIIB 胞外域 (SEQ ID NO: 44) 之胺基酸序列。

圖 10 展示圖 9 中所示之替代性核苷酸序列 (SEQ ID NO: 30) 的核苷酸 76-396 (SEQ ID NO: 31)。與圖 9 中所示相同之核苷酸取代在此處亦加底線並突出顯示。SEQ ID NO: 31 僅編碼具有 L79D 取代之經截斷 ActRIIB 胞外域 (對應於 SEQ ID NO: 1 中之殘基 25-131)，例如 ActRIIB(L79D 25-131)。

圖 11 展示 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 在化療誘發之貧



I472336

98/10/14 修正
補充

補充序列表

P1 ~ 33

<110> 艾瑟勒朗法瑪公司

<120> 使用GDF阱以增加紅血球水平

<130> PHPH-040-TW1

<140> TW 98127213

<141> 2009-02-13

<150> 61/189,094

<151> 2008-08-14

<160> 44

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 1

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
1 5 10 15

Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 2
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Ala Pro Thr
 115

<210> 3
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 3
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val

65

70

75

80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala
 100

<210> 4
 <211> 1539
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 4
 atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctgggat cgctgtggcc cggctctggg 60
 cgtggggagg ctgagacacc ggagtgcata tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
 accaaccaga gcggcctgga gcgcgtcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180
 gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaaggctg ctggctagat 240
 gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac 300
 ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatttgc agaggctggg 360
 ggcccgaaag tcacgtacga gccacccccc acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420
 tactcaactgc tgcccatcg gggccttcc ctcatcgatc tgctggcctt ttggatgtac 480
 cggcatcgca agcccccccta cggcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
 ccatccctc tggtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc 600
 tttggctgtg tcttggaaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatttccca 660
 ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtgaa cggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
 cacgagaacc tgctacagtt cattgtcgcc gagaagcgag gctccaaacct cgaagtagag 780
 ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caagggaaac 840
 atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
 ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960
 gactttaaaa gtaagaatgt attgttgc gacgacactca cagccgtgt ggctgacttt 1020
 ggcttggctg ttgcatttga gccaggaaa cctccagggg acacccacgg acaggtaggc 1080
 acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
 ttccctgcga ttgcacatgtt tgccatgggg ttgggtgtgt gggagctgt gtctcgctgc 1200
 aaggctgcag acggacccgt ggttgcgtatc atgctccctt ttgaggaaga gattggccag 1260
 cacccttcgt tggaggagct gcaggagggtg gtgggtgcaca agaagatgag gcccaccatt 1320
 aaagatcaact ggttgcacca cccggccctg gcccagctt gtgtgaccat cgaggagtgc 1380
 tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgc gcccggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
 attcggaggt cggtcaacgg cactacccctcg gactgtctcg ttccctggg gacccctgtc 1500
 accaatgtgg acctgccccca taaagagtca agcatctaa 1539

<210> 5

<211> 345
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 5
 gggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 60
 cgcaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc 120
 tacgcctcct gggccaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta 180
 gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa ccccccaggtg 240
 tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgct tcactcattt gccagaggct 300
 gggggcccccgg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccacc 345

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Asp或Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (100)..(100)
 <223> Lys或Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (212)..(212)
 <223> Asn或Ala

<400> 6
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
 35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95

Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205

Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220

Lys
 225

<210> 7
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 7
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Ala Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220

Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> 西洋蜂(Apis mellifera)

<400> 8

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

<210> 9
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知之敘述：組織纖維蛋白溶酶原活化子

<400> 9
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
 20

<210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知之敘述：天然胜肽

<400> 10
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser

<210> 11
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 11
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 20 25 30

Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
 35 40 45

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
 50 55 60

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80

Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
 85 90 95

Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
 115 120 125

Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Thr
 130 135 140

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 145 150 155 160

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 165 170 175

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 180 185 190

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 195 200 205

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 210 215 220

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 225 230 235 240

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
 245 250 255

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 275 280 285

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 290 295 300

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 305 310 315 320

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 340 345 350

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 12
 <211> 1107
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<400> 12
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
 tcgccccggcg cctctggcg tggggaggct gagacacggg agtgcacatcta ctacaacgcc 120
 aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180
 aagcggctgc actgctacgc ctcctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240
 aagggctgct gggacgatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
 gagaacccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360
 catttgcac aggtgggggg cccggaaagtc acgtacgagc caccggac agcccccacc 420
 ggtggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
 gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggc 540
 acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac 720
 aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gtccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 780
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgcggcgtg 900
 gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacggct cttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
 gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080
 agcctctccc tgtctccggg taaaatga 1107

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性胜肽

<400> 13

Thr Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性胜肽

<400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 15
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro Thr
 115

<210> 16

<211> 150

<212> PRT

<213> 鼠屬物種

<400> 16
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 17
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 豬屬物種

<400> 17
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Val Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 18
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 小鼠屬物種

<400> 18
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg

35

40

45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 19
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 19
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 20
<211> 150
<212> PRT
<213> 牛屬物種

<400> 20
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45

Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Val Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 21
<211> 150
<212> PRT
<213> 爪蟾屬物種

<400> 21
Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Ala Thr Phe
1 5 10 15

Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
20 25 30

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
35 40 45

Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser

50

55

60

Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
 85 90 95

Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn
 100 105 110

Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro
 115 120 125

Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro
 130 135 140

Ile Val Gly Leu Ser Met
 145 150

<210> 22
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 22
 Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
 20 25 30

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
 35 40 45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
 50 55 60

Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
 65 70 75 80

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
 85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
 100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
 115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
 130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile
 145 150

<210> 23
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性一致多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Thr或Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (121)..(121)
 <223> Pro, Ala, Val或Met

<400> 23
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu
 1 5 10 15

Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 35 40 45

Arg Leu Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
 50 55 60

Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Leu Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80

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

Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn
 100 105 110

Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 115 120 125

Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
 130 135 140

Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
 145 150

<210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性6xHis標籤

<400> 24

His His His His His His
1 5

<210> 25
<211> 1107
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<400> 25
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tcgcccggcg cctctggcg tggggaggct gagacacggg agtgcacatcta ctacaacgcc 120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180
aagcggctgc actgctacgc ctcctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240
aagggctgct gggatgatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
gagaacccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360
catttgcac aggtgggggg cccggaaagtc acgtacgagc caccccccac agccccccacc 420
ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactccctggg gggaccgtca 480
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggc 540
acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgcggcgtg 900
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
tccgacggct cttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080
agcctctccc tgcctccggg taaatga 1107

<210> 26
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 26
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
20 25 30

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
35 40 45

Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60

Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu
 85 90 95

Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu
 100 105 110

Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu
 115 120 125

Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300 320

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

325

330

335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 27
 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<220>
 <221> CDS
 <222> (76)..(396)

<400> 27
 atggatcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgggtggagc agtcttcgtt 60
 tcgccccggcg ccgct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg 111
 Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp
 1 5 10
 gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag 159
 Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu
 15 20 25
 cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc 207
 Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly
 30 35 40
 acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg gac gat gac ttc aac tgc 255
 Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys
 45 50 55 60
 tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac 303
 Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr
 65 70 75
 ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg 351
 Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu
 80 85 90
 cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca 396
 Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 95 100 105
 ggtgggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456
 gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 516
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc 576
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 636
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac 696
 aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 756
 aaaggcagg cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccccgggaa ggagatgacc 816
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgcgcgtg 876

gagtggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	936
tccgacggct ctttttcctt ctagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	996
ggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1056
agcctctccc tgcggg taaatga	1083

<210> 28
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 28
 Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Thr His
 100 105 110

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 130 135 140

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

210

215

220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 245 250 255

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 260 265 270

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330 335

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 29

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
 65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105

<210> 30

<211> 1083

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (76) .. (396)

<400> 30
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt
 tcgccccggcg cccccc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg 60
 Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp
 1 5 10
 gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa 159
 Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu
 15 20 25
 cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg 207
 Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly
 30 35 40
 acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg gac gac gat ttc aat tgt 255
 Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys
 45 50 55 60
 tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat 303
 Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr
 65 70 75
 ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc 351
 Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu
 80 85 90
 ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc 396
 Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 95 100 105
 ggtggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456
 gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 516
 acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc 576
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacc 636
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagttac 696
 aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 756
 aaaggcagg cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 816
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 876
 gagttggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936
 tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996
 gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1056
 aqccctccccc tqttccccqqq taaaatqa 1083

<210> 31

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<400> 31

gaaacccgcg aatgtattta ttacaatgct aattggaaac tcgaacggac gaaccaatcc	60
gggctcgaac ggtgtgaggg ggaacaggat aaacgcctcc attgctatgc gtcgtggagg	120
aactcctccg ggacgattga actggtaag aaagggtgct gggacgacga tttcaattgt	180
tatgaccgccc aggaatgtgt cgcgaccgaa gagaatccgc aggtctattt ctgttggc	240
gagggaaatt tctgtatgta acggtttacc cacctccccg aagccggcgg gcccgaggtg	300
acctatgaac ccccgccccac c	321

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 32

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn	
1	5
10	15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly	
20	25
30	

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser	
35	40
45	

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn	
50	55
60	

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val	
65	70
75	80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His	
85	90
95	

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr	
100	105
110	

Ala Pro Thr	
115	

<210> 33

<211> 1107

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<400> 33

tacctacgtt acttctctcc cgagacgaca cacgacgacg acacaccccg tcagaagcaa	60
agcggggccgc ggagacccgc acccctccga ctctgtgccc tcacgttagat gatgttgcgg	120
ttgaccctcg acctcgcgtg gttggctcg ccggaccccg cgacgcttcc gctcgtccctg	180
ttcggccgacg tgacgatgcg gaggaccgcg ttgtcgagac cgtggtagct cgagcacttc	240

ttcccgacga ccctactact	gaagttgacg atgctatccg	tcctcacaca ccggtgactc	300
ctcttgggg tccacatgaa	gacgacgaca cttccgttga	agacgttgc cgcaagtga	360
gtaaacggtc tccgacccccc	gggccttcag tgcacgtctcg	gtggggctg tcgggggtgg	420
ccaccacccctt gagtgtgtac	gggtggcacg ggtcggtggac	ttgaggaccc ccctggcagt	480
cagaaggaga aggggggttt	tgggttcctg tgggagttact	agagggcctg gggactccag	540
tgtacgcacc accacctgca	ctcggtgctt ctgggactcc	agttcaagtt gaccatgcac	600
ctgcccgcacc tccacgtatt	acggttctgt ttcggcgccc	tcctcgatcat gttgtcggtc	660
atggcacacc agtcgcagga	gtggcaggac gtggtcctga	ccgacttacc gttcctcatg	720
ttcacgttcc agaggttgtt	tcgggagggt cgggggttagc	tctttggta gaggttccgg	780
tttcccgctcg gggcttctgg	tgtccacatg tggacgggg	gtagggccct cctctactgg	840
ttcttggtcc agtcggactg	gacggaccag tttccgaaga	tagggtcgct gtacggcac	900
ctcacccctct cgttaccctgt	cggccttctg ttgatgttct	ggtgcggagg gcacgacctg	960
aggctgccga ggaagaagga	gatatcggttc gagtggcacc	tgttctcgtc caccgtcg	1020
cccttgcaga agagtacgag	gcactacgta ctccgagacg	tgttggtgat gtgcgtcttc	1080
tcggagaggg acaggggccc	atttact		1107

<210> 34
 <211> 1083

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<400> 34	tacctacgtt acttctctcc	cgagacgaca cacgacgacg	acacaccccg tcagaagcaa	60
	agcggggccgc ggcaactctg	tgccttcacg tagatgtatgt	tgcgggttgc cctcgaccc	120
	gcgtgggtgg tctcgccgga	cctcgacg cttccgtcg	tcctgttcgc cgacgtgacg	180
	atgcggagga cccggttgc	gagaccgtgg tagctcgac	acttcttccc gacgaccctg	240
	ctactgaagt tgacgatgct	atccgtcctc acacacccgt	gactcctctt gggggtccac	300
	atgaagacga cgacacttcc	gttgaagacg ttgctcgca	agttagtaaa cggtctccga	360
	ccccccggcc ttca	gttgcgttgg ggctgtccac	caccttgagt gtgtacgggt	420
	ggcacgggtc gtggacttga	ggaccccccgttgcaga	aggagaaggg ggggttttggg	480
	ttcctgtgg agtactagag	ggcctgggaa ctccagtgt	cgacaccacca cctgcactcg	540
	gtgcttctgg gactccagt	caagttgacc atgcaccc	cgacccctca cgtattacgg	600
	ttctgtttcg gccccttc	cgatgttgc	tcgtgcacccgac	660
	caggacgtgg tcctgaccga	cttaccgttc	ctcatgttca cggtccagag	720
	gagggtcggg ggtagcttt	ttggtagagg ttccgttgc	ccgtcggttgc tcttggtg	780
	cacatgtggg acgggggttag	ggcccttc	tactgggttgc tggccagtc	840
	gaccagtttc cgaagatagg	gtcgctgttag	cgacccctca ccctctcg	900

ctcttgttga tttttttttt cggagggcac gacctgaggc tgccgaggaa gaaggagata 960
 tcgttcgagt ggcacctgtt ctcgtccacc gtcgtccccc tgcagaagag tacgaggcac 1020
 tacgtactcc gagacgtgtt ggtgatgtgc gtcttctcg agagggacag gggcccattt 1080
 act 1083

<210> 35
 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之敘述：合成性多核苷酸

<400> 35
 tacctacgtt acttctctcc cgagacgaca cacgacgacg acacacctcg tcagaagcaa 60
 agcgggcccgc ggcggctttg ggcgc ttaca taaataatgt tacgattaac ctttgc 120
 gcctgcttgg tttaggcccga gcttgcaca ctcccccttg tcctatttgc ggaggtaacg 180
 atacgcagca cctccttgc gaggccctgc taacttgacc agttcttcc cacgaccctg 240
 ctgctaaagt taacaataact ggcggccctt acacagcgct ggcttctt aggccgtccag 300
 ataaagacaa caacgctccc cttaaagaca ttacttgcca aatgggtgga ggggcttcgg 360
 ccgcggggc tccactggat acttgggggc gggtggccac caccttgagt gtgtacgggt 420
 ggcacgggtc gtggacttga ggacccccc ggcagtcaga aggagaagg gggttttggg 480
 ttccctgtgg agtactagag ggcctggga ctccagtgttgc cgcaccacca cctgcactcg 540
 gtgcttctgg gactccaggta caagttgacc atgcacccgtc cgcaccacca cgtattacgg 600
 ttctgtttcg ggcggccctt cgtcatgttgc tcgtgcatttgc cacaccagtc gcaggagttt 660
 caggacgtgg tcctgaccga cttaccgttc ctcatgttca cgttccagag gttgtttcg 720
 gagggtcggg ggtagctttt ttggtagagg tttcggtttc ccgtcggggc tcttgggtgtc 780
 cacatgtggg acgggggttag ggcctccctc tactggttct tggccagtc ggactggacg 840
 gaccagttc cgaagatagg gtcgctgttag cggcacctca ccctctcggtt acccgtcgcc 900
 ctcttgc tttttttttt cggagggcac gacctgaggc tgccgaggaa gaaggagata 960
 tcgttcgagt ggcacctgtt ctcgtccacc gtcgtccccc tgcagaagag tacgaggcac 1020
 tacgtactcc gagacgtgtt ggtgatgtgc gtcttctcg agagggacag gggcccattt 1080
 act 1083

<210> 36
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 36
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
 100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
 115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu
 130 135 140

<210> 37

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 37

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
 100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
 115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu
 130 135 140

<210> 38
 <211> 370
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 38

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
 100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
 115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu Thr Gly Gly
 130 135 140

Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 225 230 235 240

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
245 250 255

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
260 265 270

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
275 280 285

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
290 295 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
325 330 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
340 345 350

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
355 360 365

Gly Lys
370

<210> 39

<211> 512

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 39

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
1 5 10 15

Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro

115

120

125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

Gly Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
500 505 510

<210> 40

<211> 115

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 40

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105 110

Ala Pro Thr
115

<210> 41

<211> 100

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 41
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala
 100

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性胜肽

<400> 42

Thr Gly Gly Gly
 1

<210> 43

<211> 368

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 43

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 20 25 30

Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
 35 40 45

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
 50 55 60

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80

Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
85 90 95

Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
100 105 110

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
115 120 125

Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
130 135 140

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
145 150 155 160

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
165 170 175

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
180 185 190

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
195 200 205

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
210 215 220

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
225 230 235 240

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
245 250 255

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
260 265 270

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
275 280 285

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
290 295 300

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
305 310 315 320

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
325 330 335

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
340 345 350

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360 365

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成性多肽

<400> 44
Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105

公告本

103年10月03日修正本

103年10月03日修正替換頁

七、申請專利範圍：

1. 一種多肽的用途，其係用於製造供在需要增加紅血球水平或治療或預防貧血的患者中增加紅血球水平或治療或預防貧血之用的醫藥品，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109 之序列至少 95%一致的胺基酸序列，其中該多肽在對應於 SEQ ID NO: 1 之位置 79 處包含酸性胺基酸，且其中該多肽在基於細胞之檢定中抑制通過肌肉抑制素 (myostatin) 及/或 GDF11 之發訊。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該酸性胺基酸係麩胺酸。

3. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該酸性胺基酸係天門冬胺酸。

4. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109 之序列。

5. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-118 之序列至少 95%一致的胺基酸序列。

6. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-128 之序列至少 95%一致的胺基酸序列。

7. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-131 之序列至少 95%一致的胺基酸序列。

8. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多



肽包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-131 之序列至少 97%一致的胺基酸序列。

9.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-131 之序列。

10.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含一個部分，該部分增強以下一或多者：活體內穩定性、活體內半生期、攝取、組織定位或分布、蛋白質複合物之形成、及/或純化。

11.如申請專利範圍第 10 項之用途，其中該多肽包含源自 IgG 重鏈之恆定區。

12.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該源自 IgG 重鏈之恆定區為 Fc 域。

13.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 95%一致的胺基酸序列。

14.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列至少 97%一致的胺基酸序列。

15.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列。

16.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列至少 95%一致的胺基酸序列。

17.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該

多肽包含與 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列至少 97%一致的胺基酸序列。

18.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列。

19.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列至少 95%一致的胺基酸序列。

20.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列至少 97%一致的胺基酸序列。

21.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列。

22.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 95%一致的胺基酸序列。

23.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 97%一致的胺基酸序列。

24.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列。

25.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列至少 95%一致的胺基酸序列。

26.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該

多肽包含與 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列至少 97%一致的胺基酸序列。

27.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。

28.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列至少 95%一致的胺基酸序列。

29.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含與 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列至少 97%一致的胺基酸序列。

30.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列。

31.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽進一步包含一或多個選自以下者之經修飾胺基酸殘基：糖基化胺基酸、PEG 化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、生物素化胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸、及與有機衍生劑結合之胺基酸。

32.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽係用於製造供在需要增加紅血球水平的患者中增加紅血球水平之用的醫藥品。

33.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之用途，其中該多肽係用於製造供在需要治療或預防貧血的患者中治療或預防貧血之用的醫藥品。

34.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與

腎病相關之貧血。

35.如申請專利範圍第 34 項之用途，其中該患者患有與慢性腎病相關之貧血。

36.如申請專利範圍第 34 項之用途，其中該患者患有與急性腎病相關之貧血。

37.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與慢性腎臟疾病相關之貧血。

38.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與慢性腎衰竭相關之貧血。

39.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與乳癌相關之貧血。

40.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與多發性骨髓瘤相關之貧血。

41.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與鐮狀細胞病相關之貧血。

42.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與地中海貧血相關之貧血。

43.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與化療治療相關之貧血。

44.如申請專利範圍第 43 項之用途，其中該化療治療為紫杉烷 (taxane)。

45.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有失血所致之貧血。

46.如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該患者患有與

脊髓發育不良症候群相關之貧血。

八、圖式：

如次頁