201625288

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201625288 A

(43)公開日： 中華民國 105 (2016) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：104133276 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 10 月 08 日

(51)Int. Cl.： *A61K38/17 (2006.01)* *C07K14/705 (2006.01)*
C07K19/00 (2006.01) *A61P9/00 (2006.01)*
G01N33/577 (2006.01) *C12Q1/68 (2006.01)*

(30)優先權：2014/10/09 美國 62/062,021
2014/11/11 美國 62/078,321
2015/01/14 美國 62/103,515
2015/05/27 美國 62/167,052
2015/06/02 美國 62/170,015

(71)申請人：西建公司 (美國) CELGENE CORPORATION (US)
美國
美國華盛頓大學 (美國) WASHINGTON UNIVERSITY (US)
美國

(72)發明人：魯嘉 基斯 HRUSKA, KEITH (US)；方一夫 FANG, YIFU (CN)；史密斯 威廉 SMITH, WILLIAM (US)；陳 念航 CHEN, NIANHANG (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：80 項 圖式數：37 共 507 頁

(54)名稱

使用ＡＣＴＲＩＩ配位體捕捉以治療心血管疾病

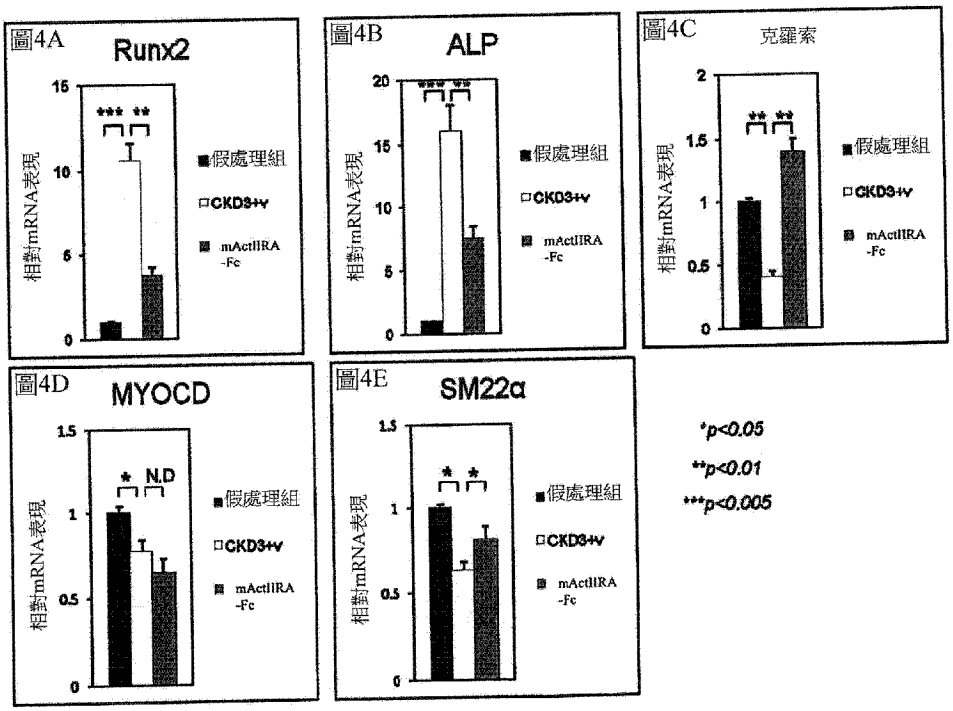
TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE USING ACTRII LIGAND TRAPS

(57)摘要

本文提供用活化素 II 型受體信號傳導抑制劑治療個體之與血管鈣化相關之疾病及/或心血管疾病之方法，其藉由使用生物標記之水準作為該個體對該治療之反應、該治療之功效或該治療之合適劑量的指示。本文提供用活化素 II 型受體信號傳導抑制劑在個體中骨骼再吸收之方法，其藉由使用生物標記之水準作為該個體對該治療之反應、該治療之功效或該治療之合適劑量的指示。

Provided herein are methods of treating diseases associated with vascular calcification and/or cardiovascular disease in a subject by using the level of a biomarker as an indicator(s) of responsiveness of the subject to the treatment, efficacy of the treatment, or appropriate dosage for the treatment with an activin type II receptor signaling inhibitor. Provided herein are methods of bone resorption in a subject by using the level of a biomarker as an indicator(s) of responsiveness of the subject to the treatment, efficacy of the treatment, or appropriate dosage for the treatment with an activin type II receptor signaling inhibitor.

指定代表圖：


圖4A
Runx2
相對mRNA表現
假處理組
CKD3+v
mActIIRA-Fc
圖4B
ALP
圖4C
克羅索
圖4D
MYOCD
N.D
圖4E
SM22α
*p<0.05
**p<0.01
***p<0.005

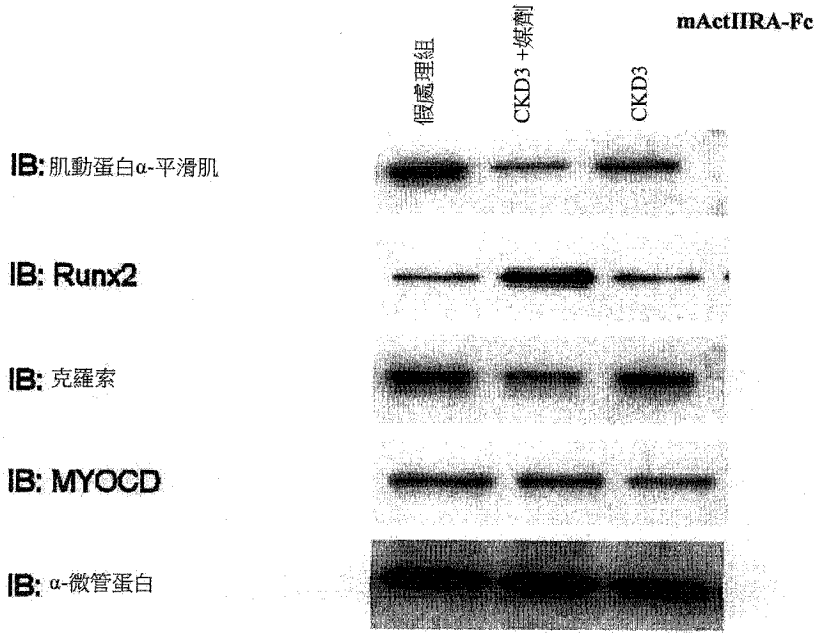

mActIIRA-Fc
假處理組
CKD3 +媒劑
CKD3
IB: 肌動蛋白α-平滑肌
IB: Runx2
IB: 克羅索
IB: MYOCD
IB: α-微管蛋白

圖4F

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

使用ACTRII配位體捕捉以治療心血管疾病

TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE USING ACTRII LIGAND TRAPS

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2014年10月9日申請之美國臨時專利申請案第62/062,021號、2014年11月11日申請之美國臨時專利申請案第62/078,321號、2015年1月14申請之美國臨時專利申請案第62/103,515號、2015年5月27日申請之美國臨時專利申請案第62/167,052號及2015年6月2日申請之美國臨時專利申請案第62/170,015號之優先權益，該等申請案中之每一者之全部內容以引用之方式且出於所有目的併入本文中。

政府許可權

本發明根據美國國家衛生研究院(National Institutes of Health)授予之授權號DK070790及DK089137在政府支持下進行。政府具有本發明中之特定權利。

序列表

本申請案與以文件名12827_934_228_SeqListing.txt提交，大小為208個千位元組，在2015年10月6日創建之序列表一起申請。序列表以全文引用之方式且出於所有目的併入本文中。

【技術領域】

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由

腎病引起之心血管疾病之方法，其包含向個體投與活化素II型受體信號傳導抑制劑(ActRII信號傳導抑制劑，例如活化素配位體捕捉劑)。更具體言之，本文提供選擇個體以用於用活化素II型受體(ActRII)信號傳導抑制劑治療心血管疾病、血管鈣化、動脈硬度水準升高、左心室肥大、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病、與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病、與左心室肥大相關及/或由左心室肥大引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病之方法，其藉由使用一或多種生物標記，尤其蝸牛同源物1 (Snail)、磷酸化smad2 (phosphosmad2)、磷酸化smad3 (phosphosmad3)、尿蛋白、迪科科普夫(dickkopf)同源物1 (Dkk1)、1型α 1膠原蛋白(Col1a1)、活化素(例如游離活化素)、倫特相關轉錄因子2 (runt-related transcription factor 2，Runx2)、鹼性磷酸酶(Alp)、骨特異性鹼性磷酸酶(BSAP)、奧斯特里克斯(Osterix)、C端1型膠原蛋白端肽(CTX)、克羅索(Klotho)、α-平滑肌肌動蛋白(α-SMA)、心肌素(MYOCD)、軸抑制蛋白2 (Axin2)及/或平滑肌蛋白22-α (Sm22-α)之水準及/或活性作為個體對治療之反應、治療之功效或治療之合適劑量的指示。本文提供減少個體之骨骼再吸收之方法，其包含向個體投與ActRII信號傳導抑制劑。更具體言之，本文提供選擇個體以用於用ActRII信號傳導抑制劑減少骨骼再吸收之方法，其藉由使用一或多種生物標記，尤其Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、奧斯特里克斯、CTX、克羅索、α-SMA、MYOCD及/或Sm22-α之水準及/或活性作為個體對治療之反應、治療之功效或治療之合適劑量的指示。

【先前技術】

包括貧血之腎病之常見併發症為血管鈣化，其在多數情況下導

致心血管疾病。在腎病個體中，動脈粥樣硬化及所得心血管疾病可導致除與腎病本身相關之死亡率之外的顯著死亡率。因而，繼續需要用於腎病個體之心血管疾病的新穎藥物及治療及/或預防方法之發現及發展。另外，因為腎病個體常常遭受貧血，用單一療法治療貧血及伴隨心血管疾病(目前使用之紅血球生成刺激劑(ESA)，諸如紅血球生成素不具有之能力)將為有利的。

兩種相關II型受體，ActRIIA及ActRIIB已經鑑定為活化素之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，包括BMP7、Nodal、GDF8及GDF11以生物化學方式相互作用(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，且ALK-7可充當活化素，以及尤其活化素B之受體。

由人類化融合蛋白(其由IIA型活化素受體(ActRIIA)之細胞外結構域及人類IgG1 Fc組成)組成之活化素配位體捕捉劑(在本文中稱為ActRIIA-hFc或「索塔特賽普特(Sotatercept)」；SEQ ID NO:7)目前在用於患有與末期腎病(ESRD)相關之貧血及骨骼病症之個體以及患有β-地中海貧血症之彼等個體之治療的II期臨床試驗中評估。在健康絕經後女性中，ActRIIA-hFc顯示顯著增加血容比(Hct)及血色素(Hgb)以及骨礦物質密度。

【發明內容】

本文提供治療及/或預防個體之血管鈣化之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有：(a)與參考群體之Runx2

水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之2A型活化素受體(ActRIIA)水準相比，降低之ActRIIA水準。關於參考群體之描述參見例如章節1.6。

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有：(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相

比，升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有：(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準，且其中心血管疾病與血管鈣化相關及/或由

血管鈣化引起。

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有：(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準，且其中心血管疾病與腎病相關及/或由腎病引起。

本文提供減少個體之骨骼再吸收之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群

體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

本文提供治療及/或預防個體之動脈硬度之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有：(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-

α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

本文提供治療及/或預防個體之左心室肥大之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中該個體具有：(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；(c)與參考群體之Snai1水準相比，升高之Snai1水準；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；(g)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，升高之活化素水準；(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；(i)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；(j)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之醫藥學上有效劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg、或約1 g或約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約

0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之醫藥學上有效劑量為約0.1 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之醫藥學上有效劑量為約0.3 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之醫藥學上有效劑量為約0.5 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之醫藥學上有效劑量為約0.7 mg/kg。

在某些實施例中，醫藥學上有效劑量經由注射投與。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量(i)每28天投與一次；或(ii)每42天投與一次。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量每14天投與一次。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量每21天投與一次。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量連續及/或無限投與。

在某些實施例中，升高之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準分別比參考群體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%。

在某些實施例中，升高之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準分別等於參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準，或比該等水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、

90%、100%、200%或500%。

在某些實施例中，降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別比參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

在某些實施例中，降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別等於參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準，或比該等水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

本文提供治療及/或預防個體之血管鈣化之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、

MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑；且其中心血管疾病與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水

準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑；且其中心血管疾病與腎病相關及/或由腎病引起。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

本文提供減少個體之骨骼再吸收之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑。在某些實施例中，骨骼再吸收如章節1.6中所描述評估。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

本文提供治療及/或預防個體之動脈硬度之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水

準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1 colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑。在某些實施例中，動脈硬度如章節1.6中所描述評估。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

本文提供治療及/或預防個體之左心室肥大之方法，其中該方法包含：(a)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(b)獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第一量測值；(c)在一段時間之後，獲取個體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之第二量測值；及(d)向個體投與經調整劑量之II型活化素受體信號傳導抑制劑。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。在某些實施例中，劑量如章節1.3.4中所描述進行調整。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之初始劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg、或約1 g或約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg。在某些實施例中，ActRII

信號傳導抑制劑之初始劑量為約0.1 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之初始劑量為約0.3 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之初始劑量為約0.5 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之初始劑量為約0.7 mg/kg。

在某些實施例中，初始劑量經由注射投與。在某些實施例中，初始劑量(i)每28天投與一次；或(ii)每42天投與一次。在某些實施例中，初始劑量每14天投與一次。在某些實施例中，初始劑量每21天投與一次。

在某些實施例中，若出現以下情況，則ActRII信號傳導抑制劑之經調整劑量高於初始劑量：(a)與參考群體之Runx2水準相比，Runx2水準升高；(b)與參考群體之Alp水準相比，Alp水準升高；(c)與參考群體之Snail水準相比，Snail水準升高；(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，磷酸化smad2水準升高；(e)與參考群體之Dkk1水準相比，Dkk1水準升高；(f)與參考群體之Colla1水準相比，Colla1水準升高；(g)與參考群體之活化素水準相比，活化素水準升高；(h)與參考群體之BSAP水準相比，BSAP水準升高；(i)與參考群體之CTX水準相比，CTX水準升高；(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，奧斯特里克斯水準升高；(k)與參考群體之克羅索水準相比，克羅索水準降低；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，α-SMA水準降低；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，MYOCD水準降低；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，Sm22-α水準降低；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，磷酸化smad3水準升高；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，尿蛋白水準升高；(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，ActRIIA水準降低；及/或(r)與參考群體之Axin2水準相比，Axin2水準降低。

在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量高約2.5 mg、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、或約35 mg，或比初始劑量高約0.05

mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.15 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.35 mg/kg、約0.4 mg/kg或約0.5 mg/kg。在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量更頻繁地投與。在某些實施例中，經調整劑量每5、10、15、20、25、28、30、35或40天投與。

在某些實施例中，若出現以下情況，則ActRII信號傳導抑制劑之經調整劑量低於初始劑量：(a)與參考群體之Runx2水準相比，Runx2水準降低；(b)與參考群體之Alp水準相比，Alp水準降低；(c)與參考群體之BSAP水準相比，BSAP水準降低；(d)與參考群體之Snai1水準相比，Snai1水準降低；(e)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，磷酸化smad2水準降低；(f)與參考群體之Dkk1水準相比，Dkk1水準降低；(g)與參考群體之col1a1水準相比，col1a1水準降低；(h)與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準相比，活化素(例如游離活化素)水準降低；(i)與參考群體之CTX水準相比，CTX水準降低；(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，奧斯特里克斯水準降低；(k)與參考群體之克羅索水準相比，克羅索水準升高；(l)與參考群體之α-SMA水準相比，α-SMA水準升高；(m)與參考群體之MYOCD水準相比，MYOCD水準升高；(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，Sm22-α水準升高；(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，磷酸化smad3水準降低；(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，尿蛋白水準降低；(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，ActRIIA水準升高；及/或(r)與參考群體之Axin2水準相比，Axin2之升高。

在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量低約2.5 mg、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、或約35 mg，或比初始劑量低約0.05 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.15 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.35 mg/kg、約0.4 mg/kg或約0.5 mg/kg。在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量較不頻繁地投與。在某些實施例中，經調整劑量每30、

35、40、42、50、60、70、80或90天投與。在某些實施例中，經調整劑量連續及/或無限投與。

在某些實施例中，在開始治療之前獲取第一量測值。在某些實施例中，第一量測值在開始治療之後立即獲取或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取。在某些實施例中，第二量測值在開始治療之後立即獲取或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月內獲取。

在某些實施例中，(a)升高之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準分別比參考群體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或(b)降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA Axin2、及/或Sm22-α水準分別比參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

在某些實施例中，(a)升高之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準分別等於參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯之水準，或比該等水

準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或(b)降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別等於參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準，或比該等水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

在某些實施例中，(a)升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別比參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或(b)降低之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準分別比參考群體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

在某些實施例中，(a)升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別等於參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準，或比該等水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或(b)降低之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準分別等於參考群體中之後

10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯之水準，或比該等水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準分別為Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之蛋白質水準。在某些實施例中，蛋白質水準藉由酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA)測定。在某些實施例中，ELISA用以下進行：(a)用以測定Runx2水準之Runx2特異性抗體SC-390715 (Santa Cruz)；(b)用以測定Alp水準之Alp特異性抗體SC-98652 (Santa Cruz)；(c)用以測定Snail水準之Snail特異性抗體sc-393172 (Santa Cruz)；(d)用以測定磷酸化smad2水準之磷酸化smad2特異性抗體sc-101801 (Santa Cruz)；(e)用以測定Dkk1水準之Dkk1特異性抗體sc-374574 (Santa Cruz)；(f)用以測定col1a1水準之Col1a1特異性抗體sc-8784 (Santa Cruz)；(g)用以測定活化素水準之活化素特異性抗體A1594 (Sigma Aldrich)；(h)用以測定BSAP水準之BSAP特異性抗體SC-98652 (Santa Cruz)；(i)用以測定CTX水準之CTX特異性抗體ABIN1173415 (Antibodies Online)；(j)用以測定奧斯特里克斯水準之奧斯特里克斯特異性抗體SC-22538 (Santa Cruz)；(k)用以測定克羅索水準之克羅索特異性抗體SC-22218 (Santa Cruz)；(l)用以測定α-SMA水準之α-SMA特異性抗體SC 53142 (Santa Cruz)；(m)用以測定

MYOCD水準之MYOCD特異性抗體SC-21561 (Santa Cruz)；(n)用以測定Sm22-α水準之Sm22-α特異性抗體SC-271719 (Santa Cruz)；(o)用以測定磷酸化smad3水準之磷酸化smad3特異性抗體sc-11769 (Santa Cruz)；及/或(p)用以測定ActRIIA水準之ActRIIA特異性抗體ab 135634 (Abcam)。

在某些實施例中，Snail、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準分別為Snail、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之mRNA水準。在某些實施例中，mRNA水準藉由定量反轉錄聚合酶鏈反應(qRT-PCR)測定。在某些實施例中，qRT-PCR用以下進行：(a)用以測定Runx2水準之Runx2特異性引子(SEQ ID NO:48及49)；(b)用以測定Alp水準之Alp特異性引子SEQ ID NO:50及51)；(c)用以測定Snail水準之Snail特異性引子(SEQ ID NO:78及79)；(d)用以測定Dkk1水準之Dkk1特異性引子(SEQ ID NO:80及81)；(e)用以測定col1a1水準之col1a1特異性引子(SEQ ID NO:82及83)；(f)用以測定活化素水準之活化素特異性引子(SEQ ID NO:84及85)；(g)用以測定奧斯特里克斯水準之奧斯特里克斯特異性引子(SEQ ID NO:52及53)；(h)用以測定克羅索水準之克羅索特異性引子(SEQ ID NO:54及55)；及/或(i)用以測定Sm22-α水準之Sm22-α特異性引子(SEQ ID NO:56及57)。

在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2、ActRIIA、Axin2及/或α-SMA水準在組織中。在某些實施例

中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad3、尿蛋白、磷酸化smad2、ActRIIA、Axin2及col1a1水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。

在某些實施例中，Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或α-SMA水準在主動脈中。

在某些實施例中，血管鈣化為鈣化動脈粥樣硬化、鈣化中層血管病變(亦稱為蒙克貝格中層鈣化硬化(Mönckeberg's medial calcific sclerosis))、中層鈣化、彈性組織鈣質沉著(elastocalcinosis)、鈣化尿毒症動脈病、鈣化主動脈瓣狹窄或門靜脈鈣化。

在某些實施例中，心血管疾病為與血管鈣化(諸如動脈粥樣硬化)、高脂質血症、骨質疏鬆、高血壓、發炎、2型糖尿病、末期腎病、所需切除術、彈性假黃瘤、先天性二尖瓣、風濕性心臟病、門靜脈高血壓或肝病相關之疾病。

在某些實施例中，心血管疾病繼發於慢性腎病。在某些實施例中，慢性腎病為3、4或5期慢性腎病。在某些實施例中，慢性腎病為慢性腎病礦物質及骨骼疾病。

在某些實施例中，個體患有高轉換骨病，例如高轉換腎性骨營養不良(ROD)。

本文亦提供一種治療高轉換骨病，例如高轉換ROD之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效量之ActRII信號傳導抑制劑。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之多肽：(a)與SEQ ID NO:2 90%一致；(b)與SEQ ID NO:2 95%一致；(c)與SEQ ID NO:2 98%一致；(d) SEQ ID NO:2；(e)與SEQ ID NO:3 90%一致；(f)與SEQ ID NO:3 95%一致；(g)與SEQ ID NO:3 98%一致；(h) SEQ ID NO:3；(i)與SEQ ID NO:6 90%一致；(j)與SEQ ID NO:6 95%一致；(k)與SEQ ID NO:6 98%一致；(l) SEQ ID NO:6；(m)與SEQ ID NO:7 90%一致；(n)與SEQ ID NO:7 95%一致；(o)與SEQ ID NO:7 98%一致；(p) SEQ ID NO:7；(q)與SEQ ID NO:12 90%一致；(r)與SEQ ID NO:12 95%一致；(S)與SEQ ID NO:12 98%一致；(t) SEQ ID NO:12；(u)與SEQ ID NO:17 90%一致；(v)與SEQ ID NO:17 95%一致；(w)與SEQ ID NO:17 98%一致；(x) SEQ ID NO:17；(y)與SEQ ID NO:20 90%一致；(z)與SEQ ID NO:20 95%一致；(aa)與SEQ ID NO:20 98%一致；(bb) SEQ ID NO:20；(cc)與SEQ ID NO:21 90%一致；(dd)與SEQ ID NO:21 95%一致；(ee)與SEQ ID NO:21 98%一致；及(ff) SEQ ID NO:21。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之多肽。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為由ActRIIA之細胞外結構域及人類IgG1 Fc結構域組成之人類化融合蛋白。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為索塔特賽普特(SEQ ID NO:7；參見例如章節2)。索塔特賽普特為適用於本文所描述之方法之活化素配位體捕捉劑(參見章節1)。

在某些實施例中，個體為人類。

【圖式簡單說明】

圖1A描繪與野生型及假處理模型相比，腎病(CKD-3)之間質纖維化模型中之活化素-A水準(pg/ml)增加。**圖1B**描繪與野生型(WT)相比腎病之Alport模型(Alport200d)中之活化素-A水準(pg/ml)增加且在用

BMP-7處理後活化素-A水準增加。

圖2描繪與假處理組相比CKD-3模型(CKD-3 V)之腎臟及主動脈中活化素A (抑制素β) mRNA水準增加。用mActRIIA-Fc處理減少CKD-3模型中之活化素A mRNA (mActRIIA-Fc)。

圖3A描繪野生型小鼠主動脈中之ACTRII水準。**圖3B**描繪假處理小鼠主動脈中之ACTRII水準。**圖3C**描繪與圖3A及/或圖3B相比，CKD-3模型之小鼠主動脈中之ACTRII水準增加。**圖3D**描繪與圖3C相比，用mActRIIA-Fc處理之CKD-3模型之小鼠主動脈中之ACTRII水準降低。

圖4A描繪在存在(CKD3+ActRII-Fc)及不存在(CKD3+v)用ActRII信號傳導抑制劑之處理下，慢性腎病之小鼠模型中之Runx2之mRNA水準。**圖4B**描繪在存在(CKD3+ActRII-Fc)及不存在(CKD3+v)用ActRII信號傳導抑制劑之處理下，慢性腎病之小鼠模型中之Alp之mRNA水準。**圖4C**描繪在存在(CKD3+ActRII-Fc)及不存在(CKD3+v)用ActRII信號傳導抑制劑之處理下，慢性腎病之小鼠模型中之克羅索之mRNA水準。**圖4D**描繪在存在(CKD3+ActRII-Fc)及不存在(CKD3+v)用ActRII信號傳導抑制劑之處理下，慢性腎病之小鼠模型中之心肌素(MYOCD)之mRNA水準。**圖4E**描繪在存在(CKD3+ActRII-Fc)及不存在(CKD3+v)用ActRII信號傳導抑制劑之處理下，慢性腎病之小鼠模型中之Sm22-α (SM22α)之mRNA水準。

圖4F描繪與僅用媒劑處理之CKD3 (CKD3+媒劑)或假處理組相比，用ActRII信號傳導抑制劑處理之CKD-3模型(CKD3+ActRII-Fc)中之肌動蛋白α-平滑肌、Runx2、克羅索、MYOCD及α-微管蛋白之蛋白質水準。

圖5A描繪用媒劑處理後CKD-3誘導之血管鈣化(媒劑Rx)。**圖5B**描繪在用ActRII信號傳導抑制劑處理後CKD-3誘導之血管鈣化減少

(mActRIIA-Fc Rx)。

圖6A描繪與野生型(wt)、假處理組、用媒劑處理之CKD-3模型(CKD-3媒劑)相比，CKD-3誘導之鈣水準增加(CKD-3 22 wk)。用mActRIIA-Fc處理減少CKD-3誘導之鈣累積(mActRIIA-Fc)。**圖6B**描繪野生型小鼠(wt)、假處理小鼠(假處理)、CKD-3小鼠模型(CKD-3)或用ActRII信號傳導抑制劑處理之小鼠模型CKD-3 (mActRIIA-Fc)之骨體積。**圖6C**描繪野生型小鼠(wt)、假處理小鼠(假處理)、CKD-3之小鼠模型(CKD-3)或用ActRII信號傳導抑制劑處理之CKD-3之小鼠模型(mActRIIA-Fc)的破骨細胞數。**圖6D**描繪野生型小鼠(wt)、假處理小鼠(假處理)、CKD-3之小鼠模型(CKD-3)或用ActRII信號傳導抑制劑處理之CKD-3之小鼠模型(mActRIIA-Fc)的破骨細胞表面。

圖7A描繪如在育種成內皮特異性Tie2-Cre (亦稱為「Tek-Cre」)小鼠之GNZ小鼠(Stoller等人, Genesis, 2008)中進行之細胞譜系追蹤之策略。**圖7B**描繪假處理小鼠中之內皮細胞譜系追蹤。**圖7C**描繪CKD小鼠中之內皮細胞譜系追蹤。**圖7D**描繪CKD小鼠中之內皮細胞譜系追蹤。

圖8描繪個體安排。註釋：「·」指示在基線及第225天進行配對QCT量測之個體。「*」指示接受安慰劑之個體具有升高之血清紅血球生成素水準，表明方案外(off-protocol)紅血球生成素投與。「†」指示違反方案。「‡」指示個體在第29天滿足血壓升高之終止規則準則；停止研究治療，且在第36天投與救援療法，伴隨繼續隨訪。個體在基線基於不完全評估以不合格的血壓錯誤地隨機化。

圖9A描繪具有大於2%股骨頸皮層骨增加之各治療類別中之個體百分比。**圖9B**描繪具有腰椎中小樑骨質量之任何增加或減少之各治療組中之個體百分比。

圖10A描繪針對總蓋斯頓(Agatston)記分之變化之各治療類別中

之個體百分比。**圖10B**描繪針對平方根轉換之總體積記分之變化之各治療類別中之個體百分比。

圖11描繪在0.3 mg/kg (0.3)或0.5 mg/kg (0.5)之劑量下用安慰劑(PBO)或用ActRII信號傳導抑制劑治療之個體之骨骼再吸收生物標記CTX之變化百分比。

圖12A展現在10 mg/kg下一週兩次皮下用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3 R)對菊糖清除率無影響。**圖12B**展現在10 mg/kg下一週兩次皮下用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3 R)對BUN無影響。**圖12A**及**圖12B**利用如章節2.4.1.1中所描述之具有消融CKD之血管鈣化模型，其用於產生與稱為CKD-3 (對於媒劑處理，CKD-3 V)之人類CKD 3期類似，具有藉由菊糖清除率及BUN估計，與WT C57B6小鼠(WT)相比，GFR之70%降低的降低腎功能。**圖12C**展現年齡為200天之Col4α5缺乏小鼠(奧爾波特(Alport))具有等效於人類3-4期CKD之菊糖清除率降低。*p<0.05。**圖12D**展現年齡為200天之Col4α5缺乏小鼠(奧爾波特)具有等效於人類3-4期CKD之BUN升高。*p<0.05。

圖13展現CKD增加循環中之活化素及腎臟及主動脈ActRIIA表現。「WT」=野生型；「假處理」=假處理之小鼠；「CKD-3 V」=用媒劑處理之小鼠；「CKD-3 R」=用mActRIIA-Fc處理之小鼠。**圖13A**描繪如章節2.4.1.1中所描述之*ldlr-/-*高脂肪餵養CKD-3小鼠模型中循環活化素-A藉由CKD之誘導。**圖13B**描繪如章節2.4.1.1中所描述之奧爾波特氏症候群小鼠中循環活化素-A藉由CKD之誘導。**圖13C**展現小鼠腎臟及主動脈中之抑制素βA表現(活化素-A由抑制素βA基因之均二聚體形成)。**圖13D**展現腎臟勻漿中抑制素βA之蛋白質水準。1、2及3指個別樣品。**圖13E**描繪主動脈ActRIIA之免疫組織化學。在野生型(WT)及假操作之*ldlr*$^{-/-}$高脂肪餵養小鼠(假處理)之主動脈中偵測到ActRIIA表現，其在用媒劑(CKD-3 V)或mActRIIA-Fc (CKD-3

mActRIIA-Fc)處理之CKD-3小鼠中經刺激。比例尺為20 μm。**圖13F**展現與WT及假處理小鼠相比，CKD-3小鼠(用媒劑處理，CKD-3 V，或用mActRIIA-Fc處理，CKD-3 R)之循環卵泡抑素水準無變化。*p<0.05, ***p<0.005。**圖13G**展現與WT及假處理小鼠相比，CKD-3小鼠(用媒劑處理，CKD-3 V，或用mActRIIA-Fc處理，CKD-3 R)之循環卵泡抑素樣3 (Fstl3)水準無變化。*p<0.05，***p<0.005。

圖14展現CKD刺激內皮細胞至間葉細胞轉化。**圖14A**描繪小鼠育種策略之圖。ROSA26GNZ基因嵌入小鼠(GNZ小鼠)具有具終止密碼子之序列，其防止核定位GFP-LacZ報導子(GNZ)之表現。當用表現內皮細胞中之Cre重組酶(Cre)之Tek-Cre小鼠育種時，Cre重組酶(Cre)刪除藉由*loxP*側接之序列且內皮來源之所有細胞產生GNZ報導蛋白。**圖14B**至**圖14D**展現用DAPI核染色針對內皮細胞標記CD31及GFP對Tek-Cre/GNZ小鼠主動脈進行雙重免疫染色。箭頭指向雙重染色之內皮細胞。在假操作小鼠(**圖14B**)中，僅內皮細胞展現核及細胞質GFP染色。在CKD3小鼠(**圖14C及圖14D**)中，除內皮細胞以外，主動脈中膜(aortic media)及外膜中之細胞展現GFP染色(箭頭)。比例尺為20 μm。**圖14E**描繪與野生型(WT)小鼠相比，在75天大奧爾波特氏小鼠中，Snai 1 (與EnMT相關之轉錄因子(Medici, D.,等人, 2008. Molecular Biology of the Cell 19:4875-4887.))之主動脈mRNA水準增加。α微管蛋白充當內參考物。1及2指個別樣品。

圖15描繪mActRIIA-Fc對患有CKD-3之ldlr-/-高脂肪餵養之小鼠之血管鈣化的影響。**圖15A**描繪來自媒劑-(CKD-3 V)及mActRIIA-Fc處理(CKD-3 mActRIIA-Fc)之CKD-3小鼠之近端主動脈動脈粥樣硬化斑之茜素紅(Alizarin Red)染色切片。**圖15B**描繪以下小鼠群組中之主動脈鈣水準：野生型(wt)；假操作*ldlr-/-*高脂肪餵養(假處理)；在22週(處理開始之時間)安樂死之CKD-3 (CKD-3)；自22至28週用媒劑處理

之CKD-3 (CKD-3 V)；自22至28週每週兩次用mActRIIA-Fc，10 mg/kg皮下處理之CKD-3 (CKD-3)。方框表示自第25個百分分至第75個百分分之中位數(方框中之線)及四分位數範圍。誤差條表示四分位數範圍之1.5倍。使用用於多重比較之ANOVA Holm-Sidak方法比較群組，其用$p<0.05$作為顯著差異之水準。* $p<0.02$，對於各組n為8-12。

圖16展現降低之ActRIIA信號傳導對CKD刺激之心臟病之影響。**圖16A**展現*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠中之CKD-3增加心臟重量，與假處理小鼠相比，其在mActRIIA-Fc處理組中反轉。CKD-3-L係指用碳酸鑭處理之CKD-3小鼠。**圖16B**展現CKD-3產生心臟肥大(主要左心室(中間))，與假處理小鼠(左)相比，該心臟肥大在mActRIIA-Fc處理組(右)中得到預防。三色染色法染色，比例尺1 mm。**圖16C**描繪在較高放大率下左心室肌細胞之三色染色法染色，其不展現心臟纖維化之跡象。比例尺20 μm。

圖17展現CKD-3對*ldlr-/-*高脂肪餵養CKD-3小鼠及缺少Dkk1中和影響中之血管硬度之影響。**圖17A**描繪左頸總動脈之如先前所報導(Wagenseil, J.E.,等人., 2009. *Circulation Research* 104:1217-1224；Wagenseil, J.E.,等人, 2005. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 289:H1209-H1217.)進行之壓力-直徑關係。圖**17B**描繪來自野生型(WT-28週)、假操作(假處理-28週)、CKD-3 (28週)及用Dkk1單株抗體處理之CKD-3 (Dkk1 mab-28週)小鼠之上行大動脈。對於**圖17**，黑色表示WT或假操作小鼠，而空心或灰色表示CKD-3小鼠。值表示為平均值±標準差。對於頸動脈，N = 5-6隻小鼠，對於上行大動脈N = 3-6。

圖18展現腎臟及主動脈中之ActRIIA信號傳導。**圖18A**描繪藉由來自假處理、CKD-3媒劑-(CKD-3 V)及mActRIIA--處理(CKD-3 R)小鼠之腎臟(左)及主動脈(右)勻漿之西方墨點法測定之活化素信號傳

導。活化素水準在腎臟勻漿中增加但在主動脈勻漿中未增加，Alk4 (AcvR1B)及Alk2 (AcvR1) 1型受體存在於腎臟勻漿中，但CKD-3未增加Alk4磷酸化。Alk4及Alk1 (AcvRL1)存在於主動脈勻漿中。CKD-3增加腎臟中之smad2/3磷酸化但在主動脈中未增加，且增加腎臟Col1A1水準。mActRIIA-Fc處理降低腎臟磷酸化smad2/3及Col1A1水準。在主動脈中，不僅不存在CKD-3對磷酸化smad2/3水準之影響，亦不存在對磷酸化Erk (phosphoErk) 1/2水準之影響。Runx2水準藉由CKD-3增加且藉由mActRIIA-Fc標準化。**圖18B**描繪克羅索mRNA表現在CKD-3小鼠之腎臟中減少且其藉由mActRIIA-Fc-處理之校正。**圖18C**描繪如在來自假處理、CKD-3媒劑及mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟及主動脈勻漿之西方墨點法中藉由Dkk1蛋白質表現標記之Wnt信號傳導(左)，及CKD-3及mActRIIA-Fc對血漿Dkk1水準之影響(右)。

圖19描繪相對於健康供體(n=10)，患有3期CKD之患者(n=30)之血漿活化素-A水準。資料藉由使用市售ELISA套組(R&D systems, Minneapolis, MN)一式兩份量測樣品產生。對於分析，變異係數為2.7%。***p<0.002，史都登氏t測試(Student t test)。

圖20描繪野生型小鼠(WT)、假處理小鼠(假處理)、CKD-3小鼠(CKD-3 V)或用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3 R)中FGF-23之水準。

圖21A描繪野生型小鼠(WT)、假操作小鼠(假處理)、用媒劑處理之CKD-3小鼠(CKD-3 V)或用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3 R)中循環活化素A之水準。*指示p<0.005。**圖21B**描繪假操作小鼠(假處理)、用媒劑處理之CKD-3小鼠(CKD-3 V)或用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3)之骨母細胞數/骨周長數/100 mm。相較於CKD-3，對於CKD-3 V，p<0.05。**圖21C**描繪假操作小鼠(假處理)、用媒劑處理之CKD-3小鼠(CKD-3 V)或用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠

(CKD-3)之骨母細胞表面/骨骼表面百分比。相較於CKD-3，對於CKD-3 V，$p<0.05$。**圖21D**描繪假操作小鼠(假處理)、用媒劑處理之CKD-3小鼠(CKD-3 V)或用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3)之骨骼形成速率/骨母細胞。相較於CKD-3，對於CKD-3 V，$p<0.05$。

圖22A描繪在整個研究過程中在用指定劑量之安慰劑或mActRIIA-Fc治療後的個體安置。y軸上之各數表示個別個體。**圖22B**描繪在用指定劑量之安慰劑或mActRIIA-Fc處理後，腹部主動脈總蓋斯頓記分進展<15%之個體的比例。**圖22C**描繪在用指定劑量之安慰劑或mActRIIA-Fc處理後，股骨頸皮層BMD增加>2%之個體之比例。

圖23A描繪具有ActRIIA之細胞外結構域及IgG1之Fc結構域之小鼠融合蛋白(mActRIIA-Fc)之示意圖。**圖23B**描繪mActRIIA-Fc對ldlr-/-高脂肪餵養小鼠之CKD-MBD之影響的實驗設計。向四組小鼠餵入在12週(wks)齡時開始之高脂肪飲食。在12週時，進行假手術(SO)或電灼法皮層損傷(EC)。在14週時，進行SO或對側腎切除(NX)。在生命之22週，開始媒劑處理或mActRIIA-Fc, 10 mg/kg，皮下每週兩次。為了正常參考水準，WT (野生型小鼠)攝入飲食。假處理，假操作ldlr-/-高脂肪餵養小鼠；CKD-3，在22週研究以確定在開始療法時血管鈣之水準的CKD-3 ldlr-/-高脂肪餵養小鼠；CKD-3 V，媒劑處理之CKD-3 ldlr-/-高脂肪餵養小鼠；CKD-3 R，mActRIIA-Fc處理之CKD-3 ldlr-/-高脂肪餵養小鼠；WT、假處理、CKD-3 V及CKD-3 R小鼠在28週齡時安樂死。

圖24A描繪如藉由西方墨點法針對主動脈勻漿中之ActRIIA所測定的小鼠主動脈中之ActRIIA表現。**圖24B**描繪圖**24A**之免疫墨點定量。關於定量，n=4，**$p<0.01$。**圖24C**描繪ActRIIA在假處理小鼠之主動脈中之免疫螢光偵測。**圖24D**描繪ActRIIA在CKD-3小鼠之主動脈中之免疫螢光偵測。ActRIIA在主動脈VSMC中表現，但在內皮細胞

中未偵測到。與假處理相比，VSMC ActRIIA水準在CKD中仍可偵測。CD31 (箭頭)用作內皮細胞標記。細胞核藉由DAPI染色。比例尺20 μm。

圖25A顯示CKD-3使得骨母細胞蛋白(Runx2及鹼性磷酸酶(Alpl))之mRNA表現增加，且使得主動脈平滑肌細胞22α (Tagln)之水準降低，其均藉由用mActRIIA-Fc之處理反轉。主動脈心肌素(Myocd)水準藉由CKD降低，但不受mActRIIA-Fc影響。**圖25B**描繪主動脈勻漿中之蛋白質之西方墨點法。圖25C描繪圖25B之西方墨點法之免疫墨點定量。CKD使得主動脈α-平滑肌細胞肌動蛋白之水準降低及骨母細胞Runx2之水準增加，其藉由用mActRIIA-Fc之處理反轉，但心肌素水準未改變。關於定量，n=4，**p<0.01。

圖26A描繪CKD及ActRIIA配位體捕捉對患有CKD-3之ldlr-/-高脂肪餵養小鼠之主動脈鈣化之影響，其顯示來自媒劑之近端主動脈動脈粥樣硬化斑用茜素紅之染色切片。**圖26B**描繪CKD及ActRIIA配位體捕捉對患有CKD-3且用mActRIIA-Fc處理之ldlr-/-高脂肪餵養小鼠之主動脈鈣化之影響，如藉由用茜素紅染色之近端主動脈動脈粥樣硬化斑所顯示。箭頭指示內膜(i)中之鈣沈積；m-中膜。比例尺100 μm。**圖26C**描繪以下小鼠群組中之主動脈鈣水準：野生型(WT)；假操作ldlr-/-高脂肪餵養(假處理)；在22週，處理開始之時間安樂死之CKD-3 (CKD-3)；自22至28週用媒劑處理之CKD-3 (CKD-3 V)；自22至28週每週兩次用mActRIIA-Fc，10 mg/kg皮下處理之CKD-3 (CKD-3)。方框表示自第25個百分分至第75個百分分之中位數(方框中之線)及四分位數範圍。誤差條表示四分位數範圍之1.5倍。使用用於多重比較之ANOVA Holm-Sidak方法比較群組，其用p<0.05作為顯著差異之水準。*p<0.02；對於各組n為8-12。

圖27A描繪藉由來自假處理、CKD-3媒劑及CKD-3 mActRIIA-Fc

處理小鼠之主動脈勻漿之西方墨點法進行之ActRIIA信號傳導之分析。來自各組中之動物之兩個主動脈的勻漿之免疫墨點。ActRIIA及活化素(抑制素β-A)水準在來自CKD-3小鼠之主動脈勻漿中降低。Alk4 (AcvR1B)及Alk1 (AcvRL1) 1型受體存在於主動脈勻漿中。CKD-3降低主動脈中之smad2/3磷酸化，此藉由mActRIIA-Fc處理增加。CKD-3降低磷酸化-Erk 1/2水準。Runx2水準藉由CKD-3增加且藉由mActRIIA-Fc處理標準化。**圖27B**描繪p-Smad2/3免疫墨點定量，n=4，**p<0.01。

圖28A描繪野生型小鼠之主動脈中β-索烴素表現之免疫螢光顯微法。**圖28B**描繪CKD小鼠之主動脈中β-索烴素表現之免疫螢光顯微法。在血管平滑肌細胞中無β-索烴素之免疫螢光。在來自CKD小鼠之主動脈之內皮中存在β-索烴素表現。箭頭，內皮細胞中β-索烴素及CD31共定域。比例尺20 μm。**圖28C**描繪主動脈Axin2 mRNA表現水準。**圖28D**描繪如藉由來自假處理、CKD-3 V及CKD-3 R處理小鼠之主動脈勻漿之西方墨點法中的Dkk1蛋白質表現及藉由免疫墨點定量標記之Wnt信號傳導之分析，n=4。**圖28E**描繪CKD-3V及mActRIIA-Fc對血漿Dkk1水準之影響。*p<0.05，**p<0.01。

圖29A描繪mActRIIA-Fc處理對腎克羅索mRNA水準之影響且展現CKD-3降低腎臟勻漿中之克羅索基因表現水準，且mActRIIA-Fc處理與CKD-3V相比，顯著增加其。*p<0.05，**p<0.01，***p<0.005。**圖29B**描繪藉由來自假處理、CKD-3媒劑及mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟勻漿之西方墨點法進行之ActRIIA信號傳導之分析。所有免疫墨點為來自3或4個腎臟之勻漿之代表。ActRIIA水準不受CKD-3或mActRIIA-Fc影響。活化素A (抑制素β-A)水準在CKD-3小鼠之腎臟勻漿中增加(定量顯示於圖30A-B中)且藉由mActRIIA-Fc降低。Alk4 (AcvR1B)及Alk2 (AcvR1) 1型受體存在於腎臟勻漿中，但CKD-3 V或

CKD-3 R未顯著影響Alk4磷酸化。CKD-3增加腎smad2/3磷酸化且mActRIIA-Fc處理減少腎臟磷酸化smad2/3。**圖29C**描繪圖29B之免疫墨點定量，*p<0.01。

圖30A描繪來自CKD-3V mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟切片之三色染色法染色。**圖30B**描繪來自CKD-3V mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟切片之三色染色法染色。**圖30C**描繪來自CKD-3V mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟切片之三色染色法染色。**圖30D**描繪來自CKD-3 mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟切片之三色染色法染色。間質纖維化區域由箭頭標記。CKD-3 mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟具有減少之間質纖維化。比例尺50 μm。關於整個腎臟冠狀面之標記，至於何處獲取顯微照片截面，參見圖35。**圖30E**描繪mActRIIA-Fc對尿蛋白之影響。在CKD-3V小鼠中存在顯著蛋白尿，其藉由mActRIIA-Fc處理減少，*p<0.05。

圖31A描繪在動脈粥樣硬化ldlr-/-高脂肪餵養CKD-3小鼠中藉由CKD誘導循環活化素-A。**圖31B**描繪在如本文所描述之奧爾波特症候群小鼠中藉由CKD誘導循環活化素-A。**圖31C**描繪小鼠腎臟中之抑制素βA (Inhba) mRNA表現(活化素-A由抑制素βA之均二聚體形成)。**圖31D**描繪腎臟勻漿中之抑制素β-A之西方墨點法。**圖31E**描繪**圖31D**之免疫墨點定量，對於免疫墨點定量n=6；*p<0.05，**p<0.01，***p<0.005。

圖32A顯示在假處理中之腎臟免疫染色。**圖32B**顯示在CKD-3媒劑小鼠中之腎臟InhbA免疫染色。在假處理小鼠中，偶然小管周圍間質細胞表現活化素-A，但在CKD-3小鼠中，更多小管周圍間質細胞對於在不同強度水準下之活化素-A為陽性。比例尺50 μm。

圖33A及**圖33B**描繪小鼠中之類似於人類3期腎病的慢性腎病。CKD以與人類CKD之分期類似之方式在小鼠模型中分期。使用如方法 5

(章節2.10.1)中所描述之具有消融CKD之血管鈣化模型來產生與稱為CKD-3 (對於媒劑處理，CKD-3 V)之人類CKD 3期類似，具有藉由菊糖清除率及BUN估計，與WT C57B6小鼠(WT)相比，GFR之70%降低的降低腎功能。用mActRIIA-Fc (CKD-3 R)，10 mg/kg每週兩次皮下處理CKD-3小鼠對菊糖清除率或BUN無影響。

圖34描繪來自Tsuchida等人(Cell Comm. and Signaling, 2009)之ActRIIA信號傳導之圖解表示。結合至II型受體ActRIIA (對於活化素為主要)及ActRIIB (對於肌肉抑制素及GDF11為主要)之活化素、肌肉抑制素及GDF11經由smad 2、3活化信號轉導路徑，包括典型路徑。

圖35A及**圖35B**顯示CKD-3媒劑處理小鼠之腎臟(腎臟三色染色法染色)。**圖35C**及**圖35D**顯示CKD-3 mActRIIA-Fc處理小鼠之腎臟(腎臟三色染色法染色)。比例尺1 mm。由箭頭標記來自電灼法損傷之皮層表面疤痕。箭頭標明獲取圖36中之高倍顯微照片之位置。比例尺1 mm。

圖36A描繪與WT及假處理小鼠相比，在CKD-3小鼠中不存在循環卵泡抑素水準之變化。**圖36B**描繪與WT及假處理小鼠相比，在CKD-3小鼠中不存在循環卵泡抑素樣3 (Fstl3)水準之變化。

圖37描繪CKD-3小鼠之組織中活化素受體相互作用蛋白(Arip1及Arip2)之水準。Arip1在CKD-3小鼠之殘餘腎臟中強烈表現，比Arip2表現多兩倍多。Arip1在CKD-3小鼠之主動脈中在低水準下表現，而主動脈中之Arip2表現為Arip1之兩倍。

【實施方式】

1.1概述

在一個態樣中本文提供一種治療及/或預防心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病、動脈硬度水準升高(例如如藉由

血管順應性降低指示)及/或左心室肥大(LVH) (包括與動脈硬度水準升高及/或LVH相關及/或由動脈硬度水準升高及/或LVH引起之心血管疾病)之方法，其中該方法包含向需要其治療及/或預防之個體投與ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)。在某些實施例中，個體為腎病個體。ActRII信號傳導抑制劑可為ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導抑制劑。

特定言之，本文提供用ActRII信號傳導抑制劑治療及/或預防心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病、與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病、動脈硬度水準升高及/或左心室肥大(LVH)之方法，其藉由使用Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性作為患者群體之指示、作為個體對用ActRII信號傳導抑制劑之治療及/或預防之反應之指示、作為用ActRII信號傳導抑制劑之治療功效之指示或作為治療之合適劑量之指示。Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2、及/或Sm22-α之水準及/或活性亦可用於鑑定用於用ActRII信號傳導抑制劑之治療及/或預防的疾病及/或病狀。用於本文所描述之方法中之ActRII信號傳導抑制劑可為ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導抑制劑，諸如本文所描述或此項技術中已知之抑制劑中的任一者。在一較佳實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為由ActRIIA之細胞外結構域及人類IgG1 Fc結構域組成之人類化融合蛋白質(「ActRIIA-Fc」，例如SEQ ID NO:7)。

本文所提供之方法部分基於與野生型小鼠相比，在慢性腎病誘

導之血管鈣化之小鼠模型中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及奧斯特里克斯之水準升高，且克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及Sm22-α之水準降低之發現。此外，在不受理論限制的情況下，藉由mActRIIA-Fc配位體捕捉降低慢性腎病小鼠模型(ldlr-/-小鼠，高脂肪飲食)之血管鈣化。如本文中呈現之實例(參見章節2)中所示，用mActRIIA-Fc處理慢性腎病小鼠減少血管鈣化、降低主動脈鈣水準、降低磷酸化smad3水準、降低尿蛋白水準、降低磷酸化smad2水準、降低Dkk1水準、降低Runx2水準、降低Alp水準、降低BSAP水準、降低CTX水準及降低奧斯特里克斯水準，且升高克羅索水準、升高α-SMA水準、升高Axin2水準及升高Sm22-α水準。此外，本文所提供之方法部分基於在用mActRIIA-Fc處理後，慢性腎病小鼠之血管鈣化減少與Dkk1、磷酸化smad2、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準降低及克羅索、α-SMA、Axin2及/或Sm22-α水準增加相關之發現(參見實例，章節2)。綜合而言，本文中呈現之資料指示Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準可鑑定哪些個體可對ActRIIA-Fc起反應及/或可用於監測對ActRII信號傳導抑制劑之臨床反應及/或選擇目標患者群體。本文中呈現之資料亦指示ActRIIA-Fc (例如mActRIIA-Fc，或諸如SEQ ID NO:7之ActRIIA-hFc)適用於治療與慢性腎病相關之血管鈣化。另外，本文中呈現之資料亦指示ActRIIA-Fc (例如mActRIIA-Fc，或諸如SEQ ID NO:7之ActRIIA-hFc)適用於治療與Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克

斯之水準升高相關之疾病，或與克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α之水準降低相關之疾病。最後，本文中呈現之資料亦指示ActRIIA-Fc (例如mActRIIA-Fc，或諸如SEQ ID NO:7之hActRIIA-hFc)適用於減少主動脈粥樣化中之鈣沈積物、降低主動脈鈣水準、反轉CKD誘導之心臟重量增加及減少腎纖維化，且因此適用於治療心血管疾病。

本文所描述，實例(參見章節2)中說明之發現指示Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2或Sm22-α之水準及/或活性之偵測可(i)用作個體之血管鈣化程度之標記(例如血清生物標記)；(ii)用作量測個體對ActRII信號傳導抑制劑(諸如ActRIIA-Fc)之反應之標記；或(iii)用於評估在治療之後ActRII信號傳導抑制劑(諸如ActRIIA-Fc)在個體中之藥效學效果，其中個體為患有心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病之個體。因此，在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、Axin2及/或Sm22-α可用於本文所描述之方法中作為ActRIIA-Fc(例如，諸如SEQ ID NO:7之ActRIIA-hFc)治療功效之指示及/或作為對於用ActRIIA-Fc (例如，諸如SEQ ID NO:7之ActRIIA-hFc)之治療之反應不存在之指示。此外，如本文所描述，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α可用作評估ActRIIA-Fc (例如諸如SEQ ID NO:7之ActRIIA-hFc)之時程治療功效的

可靠分子標記。此外，在一特定實施例中，本文提供一種方法，其包含偵測Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α在血液中之水準及/或活性(例如偵測在與血管平滑肌細胞功能減弱相關之疾病中之異常表現)，及以視Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性而定之劑量投與ActRII信號傳導抑制劑，諸如ActRIIA-Fc。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為索塔特賽普特(SEQ ID NO:7；參見例如章節2)。索塔特賽普特為適用於本文所描述之方法之活化素配位體捕捉劑(參見章節1)。

1.2縮寫

如本文所用，「Snai 1」或「Snail」指蝸牛同源物1。參見例如Twigg and Wilkie, 1999, Hum Genet. 105(4):320-326。GenBank™寄存編號NM_005985.3提供例示性人類Snail核酸序列。GenBank™寄存編號NP_005976.2提供例示性人類Snail胺基酸序列。

如本文所用，「磷酸化smad3」係指磷酸化母本抗生存因子同源物(mothers against decapentaplegic homolog) 3。參見例如Matsuzaki, 2013, Cytokine Growth Factor Rev, 24(4):385-399。GenBank™寄存編號NM_005902.3提供例示性人類磷酸化smad3核酸序列。GenBank™寄存編號NP_005893.1提供例示性人類磷酸化smad3胺基酸序列。

如本文所用，「磷酸化smad2」係指磷酸化母本抗生存因子同源物2。參見例如Matsuzaki, 2013, Cytokine Growth Factor Rev, 24(4):385-399。GenBank™寄存編號NM_001003652.3提供例示性人類

磷酸化smad2核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001003652.1提供例示性人類磷酸化smad2胺基酸序列。

如本文所用，「Dkk1」係指迪科科普夫相關蛋白1。參見例如Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763。GenBank™寄存編號NM_012242.2提供例示性人類Dkk1核酸序列。GenBank™寄存編號NP_036374.1提供例示性人類Dkk1胺基酸序列。

如本文所用，「col1a1」係指1型α 1膠原蛋白。參見例如Korkko等人, 1998, Am. J. Hum. Genet., 62:98-110。GenBank™寄存編號XM_005257059.2提供例示性人類col1a1核酸序列。GenBank™寄存編號XP_005257116.2提供例示性人類col1a1胺基酸序列。

如本文所用，「Runx2」係指倫特相關轉錄因子2。參見例如Komori, 2010, Adv Exp Med Biol, 658:43-49。GenBank™寄存編號NM_001145920.2提供例示性人類Runx2核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001139392.1提供例示性人類Runx2胺基酸序列。

如本文所用，「Alp」或「Alpl」係指鹼性磷酸酶。如本文所用，「BSAP」係指骨特異性鹼性磷酸酶。參見例如Martins等人, 2013, Bone, 56(2):390-397。GenBank™寄存編號NM_000478.4提供例示性人類Alp核酸序列。GenBank™寄存編號NP_000469.3提供例示性人類Alp胺基酸序列。

如本文所用，「CTX」係指C端肽I型膠原蛋白。參見例如Rosen等人, 2000, Calcif Tissue Int. 66(2): 100-103。

如本文所用，「奧斯特里克斯」係指奧斯特里克斯，亦稱為Sp7轉錄因子。參見例如Cao等人, 2005, Cancer Res. 65(4):1124-1128。GenBank™寄存編號NM_001173467.2提供例示性人類奧斯特里克斯核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001166938.1提供例示性人類奧斯特里克斯胺基酸序列。

如本文所用，「克羅索」係指克羅索。參見例如Matsumura等人1998, Biochem Biophys Res Commun, 242:626-630。GenBank™寄存編號NM_004795.3提供例示性人類克羅索核酸序列。GenBank™寄存編號NP_004786.2提供例示性人類克羅索胺基酸序列。

如本文所用，「α-SMA (alpha-SMA)」或「αSMA」或「α-SMA」係指α平滑肌肌動蛋白。參見例如Nowak等人，1999, Nat. Genet. 23:208-212。GenBank™寄存編號NM_001100.3提供例示性人類α-SMA核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001091.1提供例示性人類α-SMA胺基酸序列。

如本文所用，「MYOCD」係指心肌素。參見例如Imamura等人，2010, Gene, 464:1-10。GenBank™寄存編號NM_001146312.2提供例示性人類MYOCD核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001139784.1提供例示性人類MYOCD胺基酸序列。

如本文所用，「Sm22-α (Sm22-alpha)」或「Sm22α」或「Sm22-α」係指平滑肌蛋白22α，亦稱為「轉凝蛋白(transgelin)」、「Tagln」或「Tagln1」。參見例如Camoretti-Mercado, 1998, Genomics, 49:452-457。GenBank™寄存編號NM_001001522.1提供例示性人類Sm22-α核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001001522.1提供例示性人類Sm22-α胺基酸序列。

如本文所用，「ActRII」係指II型活化素受體。如本文所用，「ActRIIA」係指IIA型活化素受體。參見例如Mathews及Vale, 1991, Cell 65:973-982。GenBank™寄存編號NM_001278579.1提供例示性人類ActRIIA核酸序列。GenBank™寄存編號NP_001265508.1提供例示性人類ActRIIA胺基酸序列。如本文所用，「ActRIIB」係指IIB型活化素受體。參見例如Attisano等人, 1992, Cell 68: 97-108。GenBank™寄存編號NM_001106.3提供例示性人類ActRIIB核酸序列。GenBank™寄

存編號NP_001097.2提供例示性人類ActRIIB胺基酸序列。

如本文所用，「Axin2」係指軸抑制劑2。GenBank™寄存編號NM_004655.3提供例示性人類Axin2核酸序列。GenBank™寄存編號NP_004646.3提供例示性人類胺基酸序列。

如本文所用，「mActRIIA-Fc」或「ActRIIA-mFc」係指小鼠活化素IIA型受體-IgG1融合蛋白。參見例如美國專利第8,173,601號。如本文所用，「mActRIIB-Fc」或「ActRIIB-mFc」係指小鼠活化素IIB型受體-IgG1融合蛋白。參見例如美國專利第8,173,601號。如本文所用，「hActRIIA-Fc」或「ActRIIA-hFc」係指人類活化素IIA型受體-IgG1融合蛋白。參見例如美國專利第8,173,601號。如本文所用，「hActRIIB-Fc」或「ActRIIB-hFc」係指人類活化素IIB型受體-IgG1融合蛋白。參見例如美國專利第8,173,601號。

如本文所用，「LVH」係指左心室肥大。

1.3治療及/或預防方法

1.3.1心血管疾病及/或血管鈣化

在某些實施例中，本文提供治療及/或預防個體之心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病、與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病、動脈硬度水準升高、左心室肥大、與左心室肥大相關及/或由左心室肥大引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)。在某些實施例中，個體為腎病個體。在某些其他實施例中，個體已診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些其他實施例中，個體尚未診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。

在某些實施例中，個體具有：與參考群體之Runx2水準及/或活性

相比，升高之Runx2水準及/或活性；與參考群體之Alp水準及/或活性相比，升高之Alp水準及/或活性；與參考群體之Snail水準及/或活性相比，升高之Snail水準及/或活性；與參考群體之磷酸化smad2水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad2水準及/或活性；與參考群體之磷酸化smad3水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad3水準及/或活性；與參考群體之尿蛋白水準及/或活性相比，升高之尿蛋白水準及/或活性；與參考群體之Dkk1水準及/或活性相比，升高之Dkk1水準及/或活性；與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，升高之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性；與參考群體之col1a1水準及/或活性相比，升高之col1a1水準及/或活性；與參考群體之BSAP水準及/或活性相比，升高之BSAP水準及/或活性；與參考群體之CTX水準及/或活性相比，升高之CTX水準及/或活性；與參考群體之奧斯特里克斯水準及/或活性相比，升高之奧斯特里克斯水準及/或活性；與參考群體之克羅索水準及/或活性相比，降低之克羅索水準及/或活性；與參考群體之α-SMA水準及/或活性相比，降低之α-SMA水準及/或活性；與參考群體之MYOCD水準及/或活性相比，降低之MYOCD水準及/或活性；與參考群體之Sm22-α水準及/或活性相比，降低之Sm22-α水準及/或活性；及/或與參考群體之ActRIIA水準及/或活性相比，降低之ActRIIA水準及/或活性。

在某些實施例中，個體具有：與個體之先前Runx2水準及/或活性相比，升高之Runx2水準及/或活性；與個體之先前Alp水準及/或活性相比，升高之Alp水準及/或活性；與個體之先前Snail水準及/或活性相比，升高之Snail水準及/或活性；與個體之先前磷酸化smad2水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad2水準及/或活性；與個體之先前磷酸化smad3水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad3水準及/或活性；與個體之先前尿蛋白水準及/或活性相比，升高之尿蛋白水準及/

或活性；與個體之先前Dkk1水準及/或活性相比，升高之Dkk1水準及/或活性；與個體之先前活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，升高之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性；與個體之先前col1a1水準及/或活性相比，升高之col1a1水準及/或活性；與個體之先前BSAP水準及/或活性相比，升高之BSAP水準及/或活性；與個體之先前CTX水準及/或活性相比，升高之CTX水準及/或活性；與個體之先前奧斯特里克斯水準及/或活性相比，升高之奧斯特里克斯水準及/或活性；與個體之先前克羅索水準及/或活性相比，降低之克羅索水準及/或活性；與個體之先前α-SMA水準及/或活性相比，降低之α-SMA水準及/或活性；與個體之先前MYOCD水準及/或活性相比，降低之MYOCD水準及/或活性；與個體之先前ActRIIA水準及/或活性相比，降低之ActRIIA水準及/或活性；及/或與個體之先前Sm22-α水準及/或活性相比，降低之Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，個體之先前Runx2水準及/或活性、個體之先前Alp水準及/或活性、個體之先前Snai1水準及/或活性、個體之先前磷酸化smad2水準及/或活性、個體之先前磷酸化smad3水準及/或活性、個體之先前尿蛋白水準及/或活性、個體之先前Dkk1水準及/或活性、個體之先前活化素(例如游離活化素)水準及/或活性、個體之先前col1a1水準及/或活性、個體之先前BSAP水準及/或活性、個體之先前CTX水準及/或活性、個體之先前奧斯特里克斯水準及/或活性、個體之先前克羅索水準及/或活性、個體之先前α-SMA水準及/或活性、個體之先前MYOCD水準及/或活性、個體之先前ActRIIA水準及/或活性及/或個體之先前Sm22-α水準及/或活性為在以下之症狀發作或診斷之前1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24或48個月的各別水準：(i)心血管疾病；(ii)血管鈣化；(iii)與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病；(iv)與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病；(v)動脈硬度水準升高；及/

或左心室肥大(LVH)。

在某些實施例中，個體根據如1.3.4中所描述之方法治療。在某些實施例中，個體之血管鈣化藉由如章節1.6中所描述量測蓋斯頓記分分析。

在某些實施例中，將用本文所提供之方法治療之個體具有如章節1.6中所描述之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性。因此，在某些特定實施例中，本文提供之方法包含(i)基於如章節1.6中所描述之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或Sm22-α之水準及/或活性選擇個體；及(ii)投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)。在一特定實施例中，個體患有心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有血管鈣化。在一特定實施例中，個體患有與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有腎病。在某些其他實施例中，個體已診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些其他實施例中，個體尚未診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些實施例中，個體之血管鈣化藉由如章節1.6中所描述量測蓋斯頓記分分析。在特定實施例中，個體已診斷有動脈硬度水準升高。在一特定實施例中，個體已診斷有LVH。在一特定實施例中，個體患有與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病。

在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性如章節1.6中所描述測定。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別為Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之蛋白質水準及/或活性。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別為Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之mRNA水準及/或活性。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD及/或ActRIIA、Axin2、α-SMA水準在組織中。在某些實施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及col1a1水準及/或

活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。在某些實施例中，相對於參考群體，活化素水準在個體中升高。在某些實施例中，個體中之卵泡抑素水準約等於參考群體中卵泡抑素之水準。

在某些實施例中，參考群體為如章節1.6中所描述之群體。在某些實施例中，個體為如章節1.4中所描述之個體。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為ActRIIA-Fc，諸如ActRIIA-hFc (例如SEQ ID NO:7)。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為如章節1.5中所描述之ActRII信號傳導抑制劑。

在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為如章節1.7中所描述之劑量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為初始劑量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量以如章節1.7中所描述之頻率投與。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量如章節1.7中所描述投與。

在某些實施例中，本文所提供之方法與第二醫藥活性劑組合利用，如章節1.8中所描述。

在某些實施例中，「治療(treat/treatment/treating)」在心血管疾病或慢性腎病的情況下分別包括心血管疾病或慢性腎病之至少一種症狀之改善。

如熟習此項技術者將認識到，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之水準及/或活性可分別與對應參考群體之水準及/或活性比較。因此，在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之一者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/

或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之兩者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之三者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之三者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之四者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之五者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之六者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-

SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之七者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之八者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之九者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十一者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十二者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十三者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性

相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十四者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十五者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十六者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之十七者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。在某些實施例中，Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白中之每一者之水準及/或活性與其在對應參考群體中之水準及/或活性相比較。

1.3.2與SNAI1、磷酸化SMAD2、DKK1、COL1A1、活化素(例如游離活化素)、RUNX2、ALP、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化SMAD3、尿蛋白、ACTRIIA、AXIN2及/或SM22-α相關之疾病

在某些實施例中，本文提供治療及/或預防一或多種與Snai1、磷

酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α相關之疾病之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)。

在某些實施例中，個體為如章節1.4中所描述之個體。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為ActRIIA-Fc，諸如ActRIIA-hFc (例如SEQ ID NO:7)。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為如章節1.5中所描述之ActRII信號傳導抑制劑。

在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為如章節1.7中所描述之劑量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為初始劑量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量以如章節1.7中所描述之頻率投與。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量如章節1.7中所描述投與。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量視如本文所描述之某些生物標記之水準及/或活性而進行調整。

在某些實施例中，本文所提供之方法與第二醫藥活性劑組合利用，如章節1.8中所描述。

1.3.3慢性腎病-礦物質/骨骼病症

在某些實施例中，本文提供治療個體之慢性腎病-礦物質骨骼病症之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)。在某些實施例中，本文提供減少個體之骨骼再吸收之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑。在某些實施例中，個體患有心血管疾病。在某些實施例中，個體患有血管鈣化。在某些實施例中，個體患有與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病。在某些實施例中，個體患有與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病。在某些實施例

中，個體為腎病個體。在某些其他實施例中，個體已診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些其他實施例中，個體尚未診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。

在某些實施例中，個體具有：與參考群體之Runx2水準及/或活性相比，升高之Runx2水準及/或活性；與參考群體之Alp水準及/或活性相比，升高之Alp水準及/或活性；與參考群體之Snail水準及/或活性相比，升高之Snail水準及/或活性；與參考群體之磷酸化smad2水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad2水準及/或活性；與參考群體之磷酸化smad3水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad3水準及/或活性；與參考群體之尿蛋白水準及/或活性相比，升高之尿蛋白水準及/或活性；與參考群體之Dkk1水準及/或活性相比，升高之Dkk1水準及/或活性；與參考群體之col1a1水準及/或活性相比，升高之col1a1水準及/或活性；與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，升高之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性；與參考群體之BSAP水準及/或活性相比，升高之BSAP水準及/或活性；與參考群體之CTX水準及/或活性相比，升高之CTX水準及/或活性；與參考群體之奧斯特里克斯水準及/或活性相比，升高之奧斯特里克斯水準及/或活性；與參考群體之克羅索水準及/或活性相比，降低之克羅索水準及/或活性；與參考群體之α-SMA水準及/或活性相比，降低之α-SMA水準及/或活性；與參考群體之MYOCD水準及/或活性相比，降低之MYOCD水準及/或活性；與參考群體之ActRIIA水準及/或活性相比，降低之ActRIIA水準及/或活性；及/或與參考群體之Sm22-α水準及/或活性相比，降低之Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或α-SMA水準在組織中。在某些實

施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、MYOCD及/或ActRIIA水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白及col1a1及/或ActRIIA水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。在某些實施例中，Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、ActRIIA及/或α-SMA水準在主動脈中。

在某些實施例中，個體具有：與個體之先前Runx2水準及/或活性相比，升高之Runx2水準及/或活性；與個體之先前Alp水準及/或活性相比，升高之Alp水準及/或活性；與個體之先前Snai1水準及/或活性相比，升高之Snai1水準及/或活性；與個體之先前磷酸化smad2水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad2水準及/或活性；與個體之先前磷酸化smad3水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad3水準及/或活性；與個體之先前尿蛋白水準及/或活性相比，升高之尿蛋白水準及/或活性；與個體之先前Dkk1水準及/或活性相比，升高之Dkk1水準及/或活性；與個體之先前活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，升高之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性；與個體之先前col1a1水準及/或活性相比，升高之col1a1水準及/或活性；與個體之先前BSAP水準及/或活性相比，升高之BSAP水準及/或活性；與個體之先前CTX水準及/或活性相比，升高之CTX水準及/或活性；與個體之先前奧斯特里克斯水準及/或活性相比，升高之奧斯特里克斯水準及/或活性；與個體之先前克羅索水準及/或活性相比，降低之克羅索水準及/或活性；與個體之先前α-SMA水準及/或活性相比，降低之α-SMA

水準及/或活性；與個體之先前MYOCD水準及/或活性相比，降低之MYOCD水準及/或活性；與個體之先前ActRIIA水準及/或活性相比，降低之ActRIIA水準及/或活性；及/或與個體之先前Sm22-α水準及/或活性相比，降低之Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，個體之先前Runx2水準及/或活性、個體之先前Alp水準及/或活性、個體之先前Snail水準及/或活性、個體之先前磷酸化smad2水準及/或活性、個體之先前磷酸化smad3水準及/或活性、個體之先前尿蛋白水準及/或活性、個體之先前Dkk1水準及/或活性、個體之先前活化素(例如游離活化素)水準及/或活性、個體之先前col1a1水準及/或活性、個體之先前BSAP水準及/或活性、個體之先前CTX水準及/或活性、個體之先前奧斯特里克斯水準及/或活性、個體之先前克羅索水準及/或活性、個體之先前α-SMA水準及/或活性、個體之先前MYOCD水準及/或活性、個體之先前ActRIIA水準及/或活性及/或個體之先前Sm22-α水準及/或活性為在CKD-MBD之症狀發作或診斷之前1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24或48個月之各別水準。

在某些實施例中，個體根據如章節1.3.4中所描述之方法治療。在某些實施例中，個體之血管鈣化藉由如章節1.6中所描述量測蓋斯頓記分分析。

在某些實施例中，將用本文所提供之方法治療之個體具有如章節1.6中所描述之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性。因此，在某些特定實施例中，本文提供之方法包含(i)基於如章節1.6中所描述之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、

ActRIIA及/或Sm22-α之水準及/或活性選擇個體；及(ii)投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)。在一特定實施例中，個體患有心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有血管鈣化。在一特定實施例中，個體患有與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有腎病。在某些其他實施例中，個體已診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些其他實施例中，個體尚未診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在一特定實施例中，個體具有升高之動脈硬度水準。在一特定實施例中，個體患有與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病。在一特定實施例中，個體患有LVH。在一特定實施例中，個體患有與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病。

在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性如章節1.6中所描述測定。在某些實施例中，升高之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或α-SMA水準在組織中。在某些實施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，

組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、ActRIIA、Axin2及MYOCD水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及col1a1水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。在某些實施例中，Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或Sm22-α之水準及/或活性分別為Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或Sm22-α之蛋白質水準及/或活性。在某些實施例中，Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或Sm22-α之水準及/或活性分別為Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA及/或Sm22-α之mRNA水準及/或活性。在某些實施例中，相對於參考群體，活化素水準在個體中升高。在某些實施例中，個體中之卵泡抑素水準約等於參考群體中卵泡抑素之水準。

在某些實施例中，參考群體為如章節1.6中所描述之群體。在某些實施例中，個體為如章節1.4中所描述之個體。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為ActRIIA-Fc，諸如ActRIIA-hFc (例如SEQ ID NO:7)。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為如章節1.5中所描述之ActRII信號傳導抑制劑。

在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為如章節1.7中所描述之劑

量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為初始劑量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量以如章節1.7中所描述之頻率投與。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量如章節1.7中所描述投與。

在某些實施例中，本文所提供之方法與第二醫藥活性劑組合利用，如章節1.8中所描述。

在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含向個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每14天一次之時間間隔向個體皮下投與0.13 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每14天一次之時間間隔向個體皮下投與0.26 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每28天一次之時間間隔向個體皮下投與0.3 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每28天一次之時間間隔向個體皮下投與0.5 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每28天一次之時間間隔向個體皮下投與0.7 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已

經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每14天一次之時間間隔向個體靜脈內投與0.1 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，本文提供治療個體之末期腎病之方法，其包含以每14天一次之時間間隔向個體皮下投與0.2 mg/kg之ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)，其中個體正進行血液透析，且其中先前已經向個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)。

1.3.4經調整給藥

在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、coll a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性可進一步用於(i)評估用於個體之合適給藥，其中個體為有待用ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)治療或正用ActRII信號傳導抑制劑治療之候選者；(ii)評估是否在治療期間調整ActRII信號傳導抑制劑之劑量；及/或(iii)評估ActRII信號傳導抑制劑之合適維持劑量。若Snail、磷酸化smad2、Dkk1、coll a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性高於或低於參考群體之水準及/或活性，則用ActRII信號傳導抑制劑之給藥可分別視Snail、磷酸化smad2、Dkk1、coll a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性而起始、增加、減少、延遲或終止。在某些實施例中，本文提供治療

及/或預防個體之心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病、與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病、CKD-MBD、動脈硬度水準升高、LVH、與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病及/或與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病之方法，其包含(i)向個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；(ii)獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性之第一量測值；(iii)在一段時間之後，獲取個體之Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性之第二量測值；及(iv)向個體投與經調整劑量之ActRII信號傳導抑制劑。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為ActRIIA-Fc，諸如ActRIIA-hFc (例如SEQ ID NO:7)。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為如章節1.5中所描述之ActRII信號傳導抑制劑。在某些其他實施例中，個體已診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些其他實施例中，個體尚未診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些實施例中，個體之血管鈣化藉由如章節1.6.6中所描述量測蓋斯頓記分分析。在某些實施例中，經調整劑量係基於第一量測值與第二量測值之間偵測到的變化。

在某些實施例中，Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性如章節1.6中所描述測定。在某些實施例中，Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化

素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別為Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白及/或Sm22-α之蛋白質水準及/或活性。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別為Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之mRNA水準及/或活性。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或α-SMA水準在組織中。在某些實施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA或Axin2水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及col1a1水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。在某些實施例中，相對於參考群體，活化素水準在個體中升高。在某些實施例中，相對於參考群體，卵泡抑素水準在個體中正常。在某些實施例中，個體之血管鈣化藉由如章節1.6中所描述量測蓋斯頓記分分析。

在某些實施例中，參考群體為如章節1.6中所描述之群體。在某

些實施例中，個體為如章節1.4中所描述之個體。

在某些實施例中，初始劑量為如章節1.7中所描述之劑量。在某些實施例中，初始劑量以如章節1.7中所描述之頻率投與。在某些實施例中，初始劑量如章節1.7中所描述投與。

在某些實施例中，第一量測值及/或第二量測值如章節1.6中所描述獲取。在某些實施例中，在開始治療之前獲取第一量測值。在某些實施例中，第一量測值在開始治療之後或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或兩個月內獲取。在某些實施例中，第二量測值在開始治療之後立即獲取或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月內獲取。

在某些實施例中，若出現以下情況，則ActRII信號傳導抑制劑之經調整劑量高於初始劑量：與參考群體之Runx2水準及/或活性相比，Runx2水準及/或活性升高；與參考群體之Alp水準及/或活性相比，Alp水準及/或活性升高；與參考群體之Snai1水準及/或活性相比，Snai1水準及/或活性升高；與參考群體之磷酸化smad2水準及/或活性相比，磷酸化smad2水準及/或活性升高；與參考群體之磷酸化smad3水準及/或活性相比，磷酸化smad3水準及/或活性升高；與參考群體之尿蛋白水準及/或活性相比，尿蛋白水準及/或活性升高；與參考群體之Dkk1水準及/或活性相比，Dkk1水準及/或活性升高；與參考群體之col1a1水準及/或活性相比，col1a1水準及/或活性升高；與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，活化素(例如游離活化素)水準及/或活性升高；與參考群體之BSAP水準及/或活性相比，BSAP水準及/或活性升高；與參考群體之CTX水準及/或活性相比，CTX水準及/或活性升高；與參考群體之奧斯特里克斯水準及/或活性

相比，奧斯特里克斯水準及/或活性升高；與參考群體之克羅索水準及/或活性相比，克羅索水準及/或活性降低；與參考群體之α-SMA水準及/或活性相比，α-SMA水準及/或活性降低；與參考群體之MYOCD水準及/或活性相比，MYOCD水準及/或活性降低；與參考群體之ActRIIA水準及/或活性相比，ActRIIA水準及/或活性降低；與參考群體之Axin2水準及/或活性相比，Axin2水準及/或活性降低；及/或與參考群體之Sm22-α水準及/或活性相比，Sm22-α水準及/或活性降低。在某些實施例中，升高之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，降低之克羅索、α-SMA、ALP、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或α-SMA水準在組織中。在某些實施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、ActRIIA、Axin2及MYOCD水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及col1a1水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。

在某些實施例中，經調整劑量為如章節1.7中所描述之劑量。在某些實施例中，經調整劑量以如章節1.7中所描述之頻率投與。在某些實施例中，經調整劑量如章節1.7中所描述投與。

在某些實施例中，個體具有：與個體之先前Runx2水準及/或活性

相比，升高之Runx2水準及/或活性；與個體之先前Alp水準及/或活性相比，升高之Alp水準及/或活性；與個體之先前Snail水準及/或活性相比，升高之Snail水準及/或活性；與個體之先前磷酸化smad2水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad2水準及/或活性；與個體之先前磷酸化smad3水準及/或活性相比，升高之磷酸化smad3水準及/或活性；與個體之先前尿蛋白水準及/或活性相比，升高之尿蛋白水準及/或活性；與個體之先前Dkk1水準及/或活性相比，升高之Dkk1水準及/或活性；與個體之先前活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，升高之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性；與個體之先前col1a1水準及/或活性相比，升高之col1a1水準及/或活性；與個體之先前BSAP水準及/或活性相比，升高之BSAP水準及/或活性；與個體之先前CTX水準及/或活性相比，升高之CTX水準及/或活性；與個體之先前奧斯特里克斯水準及/或活性相比，升高之奧斯特里克斯水準及/或活性；與個體之先前克羅索水準及/或活性相比，降低之克羅索水準及/或活性；與個體之先前α-SMA水準及/或活性相比，降低之α-SMA水準及/或活性；與個體之先前MYOCD水準及/或活性相比，降低之MYOCD水準及/或活性；與個體之先前ActRIIA水準及/或活性相比，降低之ActRIIA水準及/或活性；與個體之先前Axin2水準及/或活性相比，降低之Axin2水準及/或活性；及/或與個體之先前Sm22-α水準及/或活性相比，降低之Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，個體之先前Runx2水準及/或活性、個體之先前Alp水準及/或活性、個體之先前Snail水準及/或活性、個體之先前磷酸化smad2水準及/或活性、個體之先前磷酸化smad3水準及/或活性、個體之先前尿蛋白水準及/或活性、個體之先前Dkk1水準及/或活性、個體之先前活化素(例如游離活化素)水準及/或活性、個體之先前col1a1水準及/或活性、個體之先前BSAP水準及/或活性、個體之先前CTX水準及/或活性、個體之先

前奧斯特里克斯水準及/或活性、個體之先前克羅索水準及/或活性、個體之先前α-SMA水準及/或活性、個體之先前MYOCD水準及/或活性、個體之先前ActRIIA水準及/或活性、個體之先前Axin2水準及/或活性及/或個體之先前Sm22-α水準及/或活性為在以下之症狀發作或診斷之前1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24或48個月的各別水準：(i)心血管疾病；(ii)血管鈣化；(iii)與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病；(iv)與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病；(v) CKD-MBD；(vi)動脈硬度水準升高；(vii) LVH；(viii)與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病；及/或(ix)與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病。

在某些實施例中，若出現以下情況，則ActRII信號傳導抑制劑(例如活化素配位體捕捉劑)之經調整劑量低於初始劑量：與參考群體之Runx2水準及/或活性相比，Runx2水準及/或活性降低；與參考群體之Alp水準及/或活性相比，Alp水準及/或活性降低；與參考群體之Snai1水準及/或活性相比，Snai1水準及/或活性降低；與參考群體之磷酸化smad2水準及/或活性相比，磷酸化smad2水準及/或活性降低；與參考群體之磷酸化smad3水準及/或活性相比，磷酸化smad3水準及/或活性降低；與參考群體之尿蛋白水準及/或活性相比，尿蛋白水準及/或活性降低；與參考群體之Dkk1水準及/或活性相比，Dkk1水準及/或活性降低；與參考群體之col1a1水準及/或活性相比，col1a1水準及/或活性降低；與參考群體之活化素(例如游離活化素)水準及/或活性相比，活化素(例如游離活化素)水準及/或活性降低；與參考群體之BSAP水準及/或活性相比，BSAP水準及/或活性降低；與參考群體之CTX水準及/或活性相比，CTX水準及/或活性降低；與參考群體之奧斯特里克斯水準及/或活性相比，奧斯特里克斯水準及/或活性降低；

與參考群體之克羅索水準及/或活性相比，克羅索水準及/或活性升高；與參考群體之α-SMA水準及/或活性相比，α-SMA水準及/或活性升高；與參考群體之MYOCD水準及/或活性相比，MYOCD水準及/或活性升高；與參考群體之ActRIIA水準及/或活性相比，ActRIIA水準及/或活性升高；與參考群體之Axin2水準及/或活性相比，Axin2水準及/或活性升高；及/或與參考群體之Sm22-α水準及/或活性相比，Sm22-α水準及/或活性升高。在某些實施例中，升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，降低之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及/或α-SMA水準在組織中。在某些實施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、ActRIIA、Axin2及MYOCD水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及col1a1水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、Sm22-α、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或α-SMA水準在主動脈中。

在某些實施例中，參考群體為如章節1.6中所描述之群體。在某些實施例中，經調整劑量為如章節1.7中所描述之劑量。在某些實施

例中，經調整劑量以如章節1.7中所描述之頻率投與。在某些實施例中，經調整劑量如章節1.7中所描述投與。

在某些實施例中，本文所提供之方法與第二醫藥活性劑組合利用，如章節1.8中所描述。

如熟習此項技術者將認識到，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之水準及/或活性可獨立地且分別與對應參考群體之水準及/或活性比較，諸如以上在章節1.3.1中所描述。

1.4患者群體

根據本文所描述之方法治療之個體可為任何哺乳動物，諸如嚙齒動物及靈長類動物，且在一較佳實施例中為人類。在某些實施例中，本文所描述之方法可在任何哺乳動物(諸如嚙齒動物及靈長類動物，且在一較佳實施例中，人類個體)中用於治療心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病、與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病、高轉換ROD、動脈硬度水準升高、與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病、LVH及/或與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病；或監測及/或減少血管鈣化、動脈(例如血管)硬度、LVH、主動脈鈣水準、內皮細胞至間葉細胞轉化及/或骨骼形成；及/或增加骨礦物質密度及/或血管平滑肌細胞功能。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準。在某些實施例中，活化素水準為腎臟、血漿或主動脈活化素水準。在某些實施例中，活化素為活化素A。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與參考群體之卵泡抑素水準相比，約相等之卵泡抑素水準。在某

些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與參考群體之卵泡抑素水準相比，升高之卵泡抑素水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與參考群體之卵泡抑素水準相比，降低之卵泡抑素水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與參考群體之卵泡抑素-樣3水準相比，約相等之卵泡抑素-樣3水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與參考群體之卵泡抑素-樣3水準相比，升高之卵泡抑素-樣3水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與參考群體之卵泡抑素-樣3水準相比，降低之卵泡抑素-樣3水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與參考群體之抑制素水準相比，約相等之抑制素水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與參考群體之抑制素水準相比，升高之抑制素水準。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與參考群體之抑制素水準相比，降低之抑制素水準。在某些實施例中，個體之游離活化素水準藉由抑制素、卵泡抑素及卵泡抑素-樣3水準與活化素水準之化學計量測定。因此，在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有增加之游離活化素水準。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體不具有與如章節1.6中所描述之參考群體相比之磷酸化erk 1/2增加。在某些實施例中，磷酸化erk 1/2為主動脈磷酸化erk 1/2。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與參考群體之內皮細胞至間葉細胞轉化(EnMT)相比，增加之EnMT。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與EnMT相關之轉錄因子(諸如Snail)之增加的表現。在某些實施例中，與參考群體之骨母細胞轉化相比，個體之EnMT增加引起個體之骨母細胞轉化增加。在某些實施例中，與參考群體之血管硬度相比，個體之EnMT增

加引起個體之血管硬度增加。在某些實施例中，與參考群體之血管鈣化相比，個體之EnMT增加引起個體之血管鈣化增加。在某些實施例中，與參考群體之血管平滑肌功能相比，個體之EnMT增加引起個體之血管平滑肌功能降低。在某些實施例中，與參考群體之LVH相比，個體之EnMT增加引起個體之LVH增加。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有腎纖維化。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有腎小球硬化。

在某些實施例中，分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，根據本文所描述之方法治療之個體具有升高之Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、磷酸化smad3、尿蛋白及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)血管鈣化；及(ii)分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準相比，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)心血管疾病；及(ii)分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、

col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病；及(ii)分別與參考群體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病；及(ii)分別與參考群體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準相比，升高之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i) CKD-MBD；及(ii)分別與參考群體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯

特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)升高之動脈硬度水準；及(ii)分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病；及(ii)分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i) LVH；及(ii)分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之

Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體有(i)與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病；及(ii)分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有分別與在(i)心血管疾病；(ii)血管鈣化；(iii)與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病；(iv)與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病；(v) CKD-MBD；(vi)動脈硬度水準升高；(vii) LVH；(viii)與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病；及/或(ix)與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病之症狀發作或診斷之前1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24或48個月個體之先前Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準相比，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性，及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準及/或活性。

在某些其他實施例中，個體已診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些其他實施例中，個體尚未診斷為患有慢性腎病-礦物質骨骼病症。在某些實施例中，參考群體為如章節1.6中所描述之群體。在某些實施例中，升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準如章節1.6中所描述。在某些實施例中，降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準如章節1.6中所描述。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與Snail水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與磷酸化smad2水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與磷酸化smad3水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與尿蛋白水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與Dkk1水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與Col1a1水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與Runx2水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與Alp水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與BSAP水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與CTX水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與奧斯特里克斯水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與ActRIIA水準升高相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與克羅索水準降低相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之

個體患有與α-SMA水準降低相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與MYOCD水準降低相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與Sm22-α水準降低相關之疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與ActRIIA水準降低相關之疾病。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有心血管疾病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有血管鈣化。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病。在某些實施例中，血管鈣化如章節1.6中所描述測定。在某些實施例中，血管鈣化藉由蓋斯頓記分測定。在某些實施例中，血管鈣化為鈣化動脈粥樣硬化、鈣化中層血管病變(亦稱為蒙克貝格中層鈣化硬化)、中層鈣化、彈性組織鈣質沉著、鈣化尿毒症動脈病、鈣化主動脈瓣狹窄及/或門靜脈鈣化。在某些實施例中，與鈣化動脈粥樣硬化相關之疾病為動脈粥樣硬化、高脂質血症、骨質疏鬆、高血壓、發炎、2型糖尿病、末期腎病、所需切除術、彈性假黃瘤、高脂質血症、先天性二尖瓣、風濕性心臟病及/或肝病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體有CKD誘導之心臟重量增加。在某些實施例中，個體患有心臟肥大。在某些實施例中，個體患有肌細胞肥大。在某些實施例中，個體具有增加之動脈及/或血管硬度。在某些實施例中，個體患有LVH。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體具有與如章節1.6中所描述之參考群體相比，不合需要地高水準之主動脈鈣、血管鈣化、升高水準之動脈硬度及/或骨母細胞數目。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體與如章節1.6中所描述之參考群體相比，處於產生不合需要地高水準之主動脈鈣、血管鈣化、升高

水準之動脈硬度及/或骨母細胞數目的風險下，諸如為患有慢性腎病之個體。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體與如章節1.6中所描述之參考群體相比，在主動脈粥樣化中具有鈣沈積物。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體與如章節1.6中所描述之參考群體相比，具有升高水準之呈主動脈硬度形式之動脈硬度。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體與如章節1.6中所描述之參考群體相比，具有增加高血壓之水準之升高水準的動脈硬度。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病。在某些實施例中，腎病為慢性腎病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有慢性腎病。在某些實施例中，個體患有繼發於慢性腎病之心血管疾病。在某些實施例中，慢性腎病已達至3期、4期、5期或5D期。在一特定實施例中，腎病為末期腎病。在某些實施例中，個體之腎小球濾過率在成人中為小於60 ml/min/1.73m^{2}或在兒童個體中為小於89 ml/min/1.73m^2。參見Moe等人, 2006, Kidney International 69:1945-1953。在某些實施例中，個體為成年，其中個體之腎小球濾過率小於50 ml/min/1.73m^2、40 ml/min/1.73m^2、30 ml/min/1.73m^2、20 ml/min/1.73m^{2}或小於10 ml/min/1.73m^2。在某些實施例中，個體為兒童個體，其中兒童個體之腎小球濾過率小於80 ml/min/1.73m^2、70 ml/min/1.73m^2、60 ml/min/1.73m^2、50 ml/min/1.73m^2、40 ml/min/1.73m^2、30 ml/min/1.73m^2、20 ml/min/1.73m^{2}或小於10 ml/min/1.73m^2。不受理論束縛，成人個體中小於60 ml/min/1.73m^{2}之腎小球濾過率及兒童個體中小於89 ml/min/1.73m^{2}之腎小球濾過率引起鈣水準、磷水準、PTH水準及維生素D代謝之可偵測異常；且此等標記之異常水準引起骨骼疾病。在某些實施例中，與參考群體(諸如

如章節1.6中所描述之參考群體)相比，個體具有降低之菊糖清除率。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)相比，個體具有降低之血液脲氮水準。在某些實施例中，個體為高血磷。在某些實施例中，個體患有腎纖維化。

在某些實施例中，個體患有奧爾波特氏症候群。在某些實施例中，個體具有一或多種在COL4A5基因中之與奧爾波特氏症候群相關之體細胞突變。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有與慢性腎病相關之骨骼病理學，亦即CKD-礦物質/骨骼病症(CKD-MBD)。參見Moe等人, 2006, Kidney International 69:1945-1953。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之小樑骨體積相比，個體具有減少之小樑骨體積。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之小樑厚度相比，個體具有減少之小樑厚度。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之侵蝕表面比骨骼表面比率相比，個體具有增加之侵蝕表面比骨骼表面比率。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之破骨細胞水準相比，個體具有增加之破骨細胞水準。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨母細胞表面比骨骼表面比率相比，個體具有增加之骨母細胞表面比骨骼表面比率。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨母細胞水準相比，個體具有增加之骨母細胞水準。在某些實施例中，與參考群體(諸如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨骼形成速率相比，個體具有降低之骨骼形成速率。在某些實施例中，CKD-MBD由腎性骨營養不良及血管鈣化組成。在某些實施例中，CKD-MBD由腎性骨營養不良組成。在某些實施例中，CKD-MBD為低轉換CKD-MBD。在某些實施例中，CKD-MBD由

動脈硬度水準升高及/或LVH組成。低轉換CKD-MBD可藉由以下表1中所闡述之組織學特徵診斷。在國立腎臟基金會(National Kidney Foundation)之網站參見國立腎臟基金會，腎病結果品質計劃準則(Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines)。在某些實施例中，個體患有高轉換ROD。

表1.低轉換CKD-MBD之組織學特徵

特徵	衰弱	骨軟化病
骨骼形成		
小樑骨體積	正常、低	可變
類骨質體積	正常、低	低、正常或高
骨縫厚度	正常、低	高-極高
骨母細胞數目	低	低
骨骼形成速率	低-極低	低-極低
礦化延遲時間	正常	延長
骨骼再吸收		
侵蝕骨骼周長	正常、低	可變
破骨細胞數目	低	通常低，可能高
骨髓纖維化	不存在	低，可能正常或高
		不存在

在某些實施例中，個體正經歷血液透析。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體患有末期腎病。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體經歷透析。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體與參考群體之骨骼再吸收相比，具有增加之骨骼再吸收。在某些實施例中，增加之骨骼再吸收藉由CTX水準測定。在某些實施例中，CTX水準如章節1.6中所描述測定。在某些實施例中，骨骼再吸收如章節1.6中所描述評估。

在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體可為任何年齡。在某些實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體小於18歲。在一特定實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體小於13

歲。在另一特定實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體小於12、小於11、小於10、小於9、小於8、小於7、小於6或小於5歲。在另一特定實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體為1至3歲、3至5歲、5至7歲、7至9歲、9至11歲、11至13歲、13至15歲、15至20歲、20至25歲、25至30歲或大於30歲。在另一特定實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體為30至35歲、35至40歲、40至45歲、45至50歲、50至55歲、55至60歲或大於60歲。在另一特定實施例中，根據本文所描述之方法治療之個體為60至65歲、65至70歲、70至75歲、75至80歲或大於80歲。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有末期腎病。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體正進行血液透析。在某些實施例中，先前已經向根據本文所提供之方法治療之個體投與紅血球生成素刺激劑。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體患有末期腎病，正進行血液透析，且先前已經向其投與紅血球生成素刺激劑。

如熟習此項技術者將認識到，Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之水準及/或活性可獨立地且分別與對應參考群體之水準及/或活性比較，諸如以上在章節1.3.1中所描述。

1.5 ACTRII信號傳導抑制劑

此章節中所描述且此項技術中已知之ActRII信號傳導抑制劑可用於本文所提供之方法中。在某些實施例中，此章節中所描述之ActRII信號傳導抑制劑可用於本文所提供之方法中(參見章節1.3)。

本文中涵蓋之ActRII信號傳導受體之抑制劑包括ActRIIA信號傳導抑制劑及ActRIIB信號傳導抑制劑(參見以下)。在某些實施例中，

ActRII信號傳導抑制劑對ActRIIA信號傳導具有特異性。在其他實施例中，ActRII信號傳導抑制劑對ActRIIB信號傳導具有特異性。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑優先抑制ActRIIA信號傳導。在其他實施例中，ActRII信號傳導抑制劑優先抑制ActRIIB信號傳導。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑抑制ActRIIA信號傳導及ActRIIB信號傳導兩者。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑可為包含ActRII之活化素結合結構域之多肽。不受理論束縛，此類包含活化素結合結構域之多肽螯合活化素且藉此防止活化素信號傳導。此等包含活化素結合結構域之多肽可包含ActRII之細胞外結構域中之所有或一部分(亦即ActRIIA之細胞外結構域中之所有或一部分或ActRIIB之細胞外結構域中之所有或一部分)。在特定實施例中，ActRII之細胞外結構域可溶。

在某些實施例中，包含活化素結合結構域之多肽連接至抗體之Fc部分(例如產生包含ActRII受體之包含活化素結合結構域的多肽及抗體之Fc部分之結合物)。不受理論束縛，抗體部分賦予結合物增加之穩定性。在某些實施例中，活化素結合結構域經由連接子，例如肽連接子連接至抗體之Fc部分。

用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑包含直接或間接，細胞外或細胞內抑制ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導之分子。在一些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導抑制劑經由與受體自身之相互作用抑制ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導。在其他實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導抑制劑經由與ActRIIA及/或ActRIIB配位體，例如活化素之相互作用抑制ActRIIA信號傳導及/或ActRIIB信號傳導。

1.5.1 ACTRIIA信號傳導抑制劑

如本文所用，術語「ActRIIA」係指來自任何物種之活化素受體IIA型(ActRIIA)蛋白質之家族及藉由突變誘發或其他修飾衍生自此等ActRIIA蛋白質之變異體。本文中提及ActRIIA理解為提及目前鑑定形式中之任一者。ActRIIA家族之成員一般為跨膜蛋白，其由以下構成：具有富含半胱胺酸之區域之配位體結合細胞外結構域、跨膜結構域及具有預測絲胺酸/蘇胺酸激酶活性之細胞質結構域。

欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑包括(但不限於)活化素結合之可溶ActRIIA多肽、結合至活化素(尤其活化素A或B子單元，亦稱為β_A或β_B)且破壞ActRIIA結合之抗體、結合至ActRIIA且破壞活化素結合之抗體、針對活化素或ActRIIA結合選擇之非抗體蛋白(關於此等蛋白之實例及其設計及選擇方法，參見例如WO/2002/088171、WO/2006/055689、WO/2002/032925、WO/2005/037989、US 2003/0133939及US 2005/0238646，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)及針對活化素或ActRIIA結合選擇之可結合至Fc結構域之隨機化肽。

在某些實施例中，具有活化素或ActRIIA結合活性之兩種或兩種以上不同蛋白質(或其他部分)，尤其分別阻斷I型(例如可溶I型活化素受體)及II型(例如可溶II型活化素受體)結合位點之活化素結合子可一起連接以產生抑制ActRIIA信號傳導且因此可用於本文所描述之組合物及方法中之雙官能或多官能結合分子。在某些實施例中，抑制ActRIIA信號傳導之活化素-ActRIIA信號傳導軸拮抗劑包括核酸適體，包括用於本文所描述之組合物及方法中之小分子及其他試劑。

1.5.1.1包含ActRIIA多肽之ActRIIA信號傳導抑制劑

術語「ActRIIA多肽」包括包含ActRIIA家族成員之任何天然存在之多肽以及保留適用活性之其任何變異體(包括突變體、片段、融

合物及肽模擬物形式)的多肽。舉例而言，ActRIIA多肽包括衍生自具有與ActRIIA多肽序列至少約80%一致，且視情況至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或99%以上一致性之序列的任何已知ActRIIA序列的多肽。舉例而言，ActRIIA多肽可結合至ActRIIA蛋白及/或活化素且抑制ActRIIA蛋白及/或活化素之功能。ActRIIB多肽可針對其促進骨骼生長及骨骼礦化之能力選擇。ActRIIA多肽之實例包括人類ActRIIA前驅體多肽(SEQ ID NO:1)及可溶人類ActRIIA多肽(例如SEQ ID NO:2、3、7及12)。關於胺基酸序列在SEQ ID NO:1處描述之ActRIIA前驅體多肽，人類ActRIIA前驅體多肽之信號肽位於胺基酸位置1至20處；細胞外結構域位於胺基酸位置21至135處且人類ActRIIA前驅體多肽(SEQ ID NO:1)之N連接糖基化位點位於SEQ ID NO:1之胺基酸位置43及56處。編碼SEQ ID NO:1之人類ActRIIB前驅體多肽之核酸序列揭示為SEQ ID NO:4 (基因庫條目NM_001616之核苷酸164-1705)。編碼SEQ ID NO:2之可溶人類ActRIIA多肽之核酸序列揭示為SEQ ID NO:5。關於序列之描述參見表21。

在特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA多肽為可溶ActRIIA多肽。ActRIIA蛋白之細胞外結構域可結合至活化素且一般可溶，且因此可稱為可溶活化素結合ActRIIA多肽。因此，如本文所用，術語「可溶ActRIIA多肽」一般係指包含ActRIIA蛋白之細胞外結構域，包括ActRIIA蛋白之任何天然存在之細胞外結構域之多肽以及其任何變異體(包括突變體、片段及肽模擬物形式)。可溶ActRIIA多肽可結合至活化素；然而，相對於GDF8/11，野生型ActRIIA蛋白不展示在結合至活化素方面之顯著選擇性。可藉由使天然或變化ActRIIA蛋白與第二活化素選擇性結合劑偶合來給與其對活化素之附加特異性。可溶活化素結合ActRIIA多肽之實例包括SEQ ID NO:2、3、7、12及13中說明之可溶多肽。可溶活化素結合ActRIIA多

肽之其他實例除ActRIIA蛋白之細胞外結構域以外包含信號序列，例如蜜蜂蜂毒肽(mellitin)前導序列(SEQ ID NO:8)、組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)前導序列(SEQ ID NO:9)或天然ActRIIA前導序列(SEQ ID NO:10)。SEQ ID NO:13中所說明之ActRIIA-hFc多肽使用TPA前導序列。

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑包含結合物/融合蛋白，其包含連接至抗體之Fc部分的ActRIIA之活化素結合結構域。在某些實施例中，活化素結合結構域經由連接子，例如肽連接子連接至抗體之Fc部分。視情況，Fc結構域在殘基處具有一或多種突變，諸如Asp-265、離胺酸322及Asn-434。在某些情況下，具有此等突變中之一或多者(例如Asp-265突變)之突變Fc結構域相對於野生型Fc結構域，結合至Fc γ 受體之能力降低。在其他情況下，具有此等突變中之一或多者(例如Asn-434突變)之突變Fc結構域相對於野生型Fc結構域，結合至MHC I類相關Fc受體(FcRN)之能力增加。包含融合至Fc結構域之ActRIIA之可溶細胞外結構域的例示性融合蛋白闡述於SEQ ID NO:6、7、12及13中。

在一特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑包含連接至抗體之Fc部分的ActRIIA之細胞外結構域，或其部分，其中該ActRIIA信號傳導抑制劑包含與選自SEQ ID NO:6、7、12及13之胺基酸序列至少75%一致之胺基酸序列。在另一特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑包含連接至抗體之Fc部分的ActRIIA之細胞外結構域，或其部分，其中該ActRIIA信號傳導抑制劑包含與選自SEQ ID NO:6、7、12及13之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列。

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA

信號傳導抑制劑包含ActRIIA之細胞外結構域之截短形式。截短可在ActRIIA多肽之羧基端及/或胺基端處。在某些實施例中，相對於成熟ActRIIB多肽細胞外結構域，截短可為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個胺基酸長。在某些實施例中，截短可為成熟ActRIIA多肽細胞外結構域之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個N端胺基酸。在某些實施例中，截短可為成熟ActRIIA多肽細胞外結構域之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個C端胺基酸。舉例而言，ActRIIA之截短形式包括具有胺基酸20-119、20-128、20-129、20-130、20-131、20-132、20-133、20-134、20-131、21-131、22-131、23-131、24-131及25-131之多肽，其中胺基酸位置指在SEQ ID NO:1中之胺基酸位置。

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑包含具有一或多個胺基酸取代之ActRIIA之細胞外結構域。在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑包含亦攜帶胺基酸取代之ActRIIA細胞外結構域之截短形式。

在一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑為人類ActRIIA受體之細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白。在另一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑為人類ActRIIA受體之截短細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白。在另一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑為人類ActRIIA受體之截短細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白，其中人類ActRIIA受體之截短細胞外結構域擁有一或多個胺基

酸取代。

ActRIIA多肽之功能活性片段可例如藉由篩選以重組方式由編碼ActRIIA多肽之核酸之對應片段產生之多肽獲得。此外，片段可使用此項技術中已知之技術，諸如習知梅里菲爾德(Merrifield)固相f-Moc或t-Boc化學方法來化學合成。片段可經產生(以重組方式或藉由化學合成)且測試以鑑定可充當ActRIIA蛋白或藉由活化素介導之信號傳導之拮抗劑(抑制劑)的彼等肽基片段。

此外，ActRIIA多肽之功能活性變異體可例如藉由篩選以重組方式由編碼ActRIIA多肽之對應誘變核酸產生之修飾多肽庫獲得。變異體可經產生且測試以鑑定可充當ActRIIA蛋白或藉由活化素介導之信號傳導之拮抗劑(抑制劑)之彼等者。在某些實施例中，ActRIIA多肽之功能變異體包含與選自SEQ ID NO:2或3之胺基酸序列至少75%一致之胺基酸序列。在某些情況下，功能變異體具有與選自SEQ ID NO:2或3之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

功能變異體可例如藉由出於諸如增強治療功效或穩定性(例如離體存放期及活體內對蛋白水解降解之耐受性)的目的修飾ActRIIA多肽之結構產生。當經選擇以保留活化素結合時可將此等修飾ActRIIA多肽認為天然存在之ActRIIA多肽之功能等效物。修飾ActRIIA多肽亦可例如藉由胺基酸取代、刪除或添加產生。舉例而言，期望用異白胺酸或纈胺酸獨立置換白胺酸、用麩胺酸鹽置換天冬胺酸鹽、用絲胺酸置換蘇胺酸或用結構上相關胺基酸類似置換胺基酸(例如保守性突變)將不對所得分子之生物活性具有主要影響為合理的。保守性置換為在其側鏈中相關之胺基酸家族內進行的彼等置換。ActRIIA多肽之胺基酸序列變化是否產生功能同源物可容易地藉由評估變異ActRIIA多肽以類似於野生型ActRIIA多肽之方式在細胞中產生反應之能力確定。

在某些實施例中，本文提供之欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA信號傳導抑制劑可包含具有一或多種可改變多肽糖基化之特異性突變的ActRIIA多肽。此等突變可引入或消除一或多個糖基化位點，諸如O連接或N連接之糖基化位點。天冬醯胺連接之糖基化識別位點一般包含藉由合適細胞糖基化酶特異性識別之三肽序列，天冬醯胺-X-蘇胺酸(或天冬醯胺-X-絲胺酸)（其中「X」為任何胺基酸)。改變亦可藉由添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或藉由一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代至野生型ActRIIA多肽之序列(對於O連接之糖基化位點)進行。在糖基化識別位點之第一或第三胺基酸位置中之一者或兩者處的多種胺基酸取代或刪除(及/或在第二位置處之胺基酸刪除)引起在修飾三肽序列處之非糖基化。增加ActRIIA多肽上碳水化合物部分之數目的另一方式為藉由醣苷與ActRIIA多肽之化學或酶促偶合。視使用之偶合模式而定，糖可連接至(a)精胺酸及組胺酸；(b)游離羧基；(c)游離硫氫基，諸如半胱胺酸之彼等硫氫基；(d)游離羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之彼等羥基；(e)芳族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之彼等殘基；或(f)麩醯胺酸之醯胺基。此等方法描述於1987年9月11日公開之WO 87/05330及Aplin及Wriston(1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306頁中，其以引用的方式併入本文中。存在於ActRIIA多肽上之一或多個碳水化合物部分之移除可以化學方式及/或以酶促方式實現。化學去糖基化可涉及例如使ActRIIA多肽暴露於化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此處理使得除連接糖(N-乙醯基葡萄胺糖或N-乙醯基半乳胺糖)外之大多數或所有糖裂解，而保持胺基酸序列完整。化學去糖基化由Hakimuddin等人, (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52及由Edge等人, (1981) Anal. Biochem. 118:131進一步描述。ActRIIA多肽上碳水化合物部分之酶促裂解可藉由使用如由Thotakura等人(1987) Meth. Enzymol. 138:350所

描述之各種內醣苷酶及外醣苷酶來達成。ActRIIA多肽之序列可按需要視使用之表現系統類型而調整，因為哺乳動物、酵母、昆蟲及植物細胞可均引入可受肽之胺基酸序列影響之不同糖基化模式。一般而言，用於人類之ActRIIA蛋白可在提供適當糖基化之哺乳動物細胞株，諸如HEK293或CHO細胞株中表現，儘管其他表現系統，諸如其他哺乳動物表現細胞株、具有工程改造糖基化酶之酵母細胞株及昆蟲細胞預期同樣適用。

本文進一步提供產生突變體，尤其ActRIIA多肽之組合突變體組以及截短突變體之方法；組合突變體之池尤其適用於鑑定功能變異體序列。篩選此等組合庫之目的可為產生例如可充當促效劑或拮抗劑，或替代地一起具有新穎活性之ActRIIA多肽變異體。以下提供多種篩選分析，且此等分析可用於評估變異體。舉例而言，可針對結合至ActRIIA配位體、防止ActRIIA配位體與ActRIIA多肽之結合或干擾由ActRIIA配位體所引起之信號傳導之能力篩選ActRIIA多肽變異體。

可產生相對於天然存在之ActRIIA多肽，具有選擇性或一般增加之效能的組合衍生變異體。同樣地，突變誘發可產生具有與對應野生型ActRIIA多肽顯著不同之細胞內半衰期之變異體。舉例而言，可使改變之蛋白質對蛋白水解降解或導致天然ActRIIA多肽之破壞或者失活之其他細胞過程較穩定或較不穩定。此等變異體及編碼其之基因可用於藉由調節ActRIIA多肽之半衰期改變ActRIIA多肽水準。舉例而言，短半衰期可產生更短暫生物影響且可允許較緊密控制個體內之重組ActRIIA多肽水準。在Fc融合蛋白中，突變可在連接子(若存在)及/或Fc部分中進行以改變蛋白質之半衰期。

組合庫可藉助於編碼各包括至少一部分可能ActRIIA多肽序列之多肽庫之基因之簡併庫產生。舉例而言，可將合成寡核苷酸之混合物以酶促方式接合至基因序列中以使得簡併組之可能ActRIIA多肽核苷

酸序列可作為個別多肽，或替代地作為一組較大融合蛋白(例如用於噬菌體呈現)表現。

存在許多可由簡併寡核苷酸序列產生可能同源物庫之方式。簡併基因序列之化學合成可在自動DNA合成器中進行，且合成基因隨後接合至合適載體中以便表現。簡併寡核苷酸之合成在此項技術中眾所周知(參見例如Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3；Itakura等人, (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton編, Amsterdam: Elsevier 第273-289頁；Itakura等人, (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323；Itakura等人, (1984) Science 198:1056：Ike等人, (1983) Nucleic Acid Res. 11:477)。此等技術已經用於其他蛋白質之定向進化(參見例如Scott等人, (1990) Science 249:386-390；Roberts等人, (1992) PNAS USA 89:2429-2433；Devlin等人, (1990) Science 249: 404-406；Cwirla等人, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382；以及美國專利第5,223,409號、第5,198,346號及第5,096,815號)。

或者，可利用其他形式之突變誘發產生組合庫。舉例而言，ActRIIA多肽變異體可藉由使用例如丙胺酸掃描突變誘發及其類似技術篩選(Ruf等人, (1994) Biochemistry 33:1565-1572；Wang等人, (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099；Balint等人, (1993) Gene 137:109-118；Grodberg等人, (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601；Nagashima等人, (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892；Lowman等人, (1991) Biochemistry 30:10832-10838；及Cunningham等人, (1989) Science 244:1081-1085)、藉由連接子掃描突變誘發(Gustin等人, (1993) Virology 193:653-660；Brown等人, (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652；McKnight等人, (1982) Science 232:316)、藉由飽和突變誘發(Meyers等人, (1986) Science 232:613)、藉由PCR突變誘發

(Leung等人, (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19)或藉由隨機突變誘發，包括化學突變誘發等(Miller等人, (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.；及Greener等人, (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)產生及自庫分離。連接子掃描突變誘發(尤其在組合設置中)為鑑定截短(生物活性)形式之ActRIIA多肽之有吸引力的方法。

此項技術中已知各種用於篩選藉由點突變及截短製造之組合庫之基因產物，且就此而言用於針對具有某一特性之基因產物篩選cDNA庫的技術。此等技術將一般適合於快速篩選藉由ActRIIA多肽之組合突變誘發產生之基因庫。篩選較大基因庫之最廣泛使用之技術通常包含將基因庫選殖至可複製表現載體中，用所得載體庫轉型合適細胞，且在所需活性之偵測促進編碼產物經偵測之基因之載體之相對容易分離的條件下表現組合基因。較佳分析包括活化素結合分析及活化素介導之細胞信號傳導分析。

在某些實施例中，用於本文所描述之方法及組合物之抑制劑中的ActRIIA多肽除天然存在於ActRIIA多肽中之任何修飾以外，可進一步包含轉譯後修飾。此等修飾可包括(但不限於)乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂質化及醯化。因此，經修飾ActRIIA多肽可含有非胺基酸要素，諸如聚乙二醇、脂質、多醣或單醣及磷酸鹽。此等非胺基酸要素對ActRIIA多肽之功能性之影響可藉由熟習此項技術者已知之任何方法測試。當ActRIIA多肽在細胞中藉由裂解新生形式之ActRIIA多肽產生時，轉譯後處理亦可對於蛋白質之正確摺疊及/或功能重要。不同細胞(諸如CHO、HeLa、MDCK、293、W138、NIH-3T3或HEK293)對於此等轉譯後活性具有特定細胞機制及特徵機制且可經選擇以確保ActRIIA多肽之正確修飾及處理。

在某些態樣中，用於本文所描述之方法及組合物之抑制劑中之

ActRIIA多肽之功能變異體或修飾形式包括具有至少一部分ActRIIA多肽及一或多個融合結構域之融合蛋白。此等融合結構域之熟知實例包括(但不限於)聚組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽S轉移酶(GST)、硫氧還原蛋白、蛋白質A、蛋白質G、免疫球蛋白重鏈恆定區(Fc)、麥芽糖結合蛋白(MBP)或人類血清白蛋白。融合結構域可經選擇以便賦予所需特性。舉例而言，一些融合結構域特別適用於藉由親和性層析法分離融合蛋白。出於親和純化之目的，使用用於親和性層析法之相關基質，諸如麩胱甘肽、澱粉酵素及鎳或鈷結合樹脂。許多此等基質可以「套組」形式獲得，諸如對(HIS_6)融合搭配物適用之Pharmacia GST純化系統及QIAexpress.TM.系統(Qiagen)。作為另一實例，融合結構域可經選擇以便促進ActRIIA多肽之偵測。此等偵測結構域之實例包括各種螢光蛋白質(例如GFP)以及「抗原決定基標籤」，其通常為特異性抗體可用之短肽序列。特異性單株抗體容易可用之熟知抗原決定基標籤包括FLAG、流感病毒血球凝集素(HA)及c-myc標籤。在一些情況下，融合結構域具有蛋白酶裂解位點(諸如用於因子Xa或凝血酶)，其允許相關蛋白酶部分消化融合蛋白且藉此自其釋放重組蛋白。釋放之蛋白質可隨後藉由隨後層析分離自融合結構域分離。在某些較佳實施例中，ActRIIA多肽與活體內穩定ActRIIA多肽之結構域(「穩定劑」結構域)融合。「穩定」意謂增加血清半衰期，不論此是否由於破壞減少、腎臟清除率降低或其他藥物動力學影響之任何者。與免疫球蛋白之Fc部分融合已知賦予各種蛋白質所需藥物動力學特性。同樣地，與人類血清白蛋白融合可賦予所需特性。可選擇之其他類型之融合結構域包括多聚化(例如二聚、四聚)結構域及功能結構域(賦予額外生物功能，諸如視需要進一步刺激骨骼生長或肌肉生長)。

應瞭解融合蛋白之不同要素可以符合所需功能性之任何方式配置。舉例而言，ActRIIA多肽可針對異源結構域經置放C端，或替代

地異源結構域可針對ActRIIA多肽經置放C端。ActRIIA多肽結構域及異源結構域在融合蛋白中無需相鄰，且額外結構域或胺基酸序列可經包括C端或N端至任一結構域或結構域之間。

在某些實施例中，用於本文所描述之方法及組合物之抑制劑中之ActRIIA多肽可含有一或多種能夠穩定ActRIIA多肽之修飾。舉例而言，此等修飾可增強ActRIIA多肽之活體外半衰期，增強ActRIIA多肽之循環半衰期或減少ActRIIA多肽之蛋白水解降解。此等穩定修飾可包括(但不限於)融合蛋白(包括例如包含ActRIIA多肽及穩定劑結構域之融合蛋白)、修飾糖基化位點(包括例如添加糖基化位點至ActRIIA多肽)及修飾碳水化合物部分(包括例如自ActRIIA多肽移除碳水化合物部分)。在融合蛋白之情況下，ActRIIA多肽融合至穩定劑結構域，諸如IgG分子(例如Fc結構域)。如本文所用，術語「穩定劑結構域」不僅指如在融合蛋白之情況下的融合結構域(例如Fc)，而且包括非蛋白質修飾(諸如碳水化合物部分)，或非蛋白質聚合物(諸如聚乙二醇)。

在某些實施例中，自其他蛋白質分離或者實質上不含其他蛋白質之分離及/或純化形式之ActRIIA多肽可與本文所描述之方法及組合物一起使用。ActRIIA多肽可一般藉由自重組核酸表現產生。

在某些態樣中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIA多肽使用編碼ActRIIA多肽中之任一者(例如可溶ActRIIA多肽)之分離及/或重組核酸(包括本文所揭示之片段、功能變異體及融合蛋白)產生。舉例而言，SEQ ID NO:4編碼天然存在之人類ActRIIA前驅體多肽，而SEQ ID NO:5編碼ActRIIA之經處理細胞外結構域。此等核酸可為單股或雙股。此等核酸可為DNA或RNA分子。此等核酸可例如用於製造ActRIIA多肽之方法中或用作直接治療劑(例如在基因治療方法中)。

在某些態樣中，編碼ActRIIA多肽之核酸可包括為SEQ ID NO:4或5之變異體之核酸。變異核苷酸序列包括相差一或多種核苷酸取代、添加或刪除之序列，諸如對偶基因變異體。

在某些實施例中，編碼ActRIIA多肽之分離或重組核酸序列可與SEQ ID NO:4或5最少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%一致。一般熟習此項技術者將瞭解與SEQ ID NO:4或5互補之核酸序列及SEQ ID NO:4或5之變異體可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIA多肽。在其他實施例中，此等核酸序列可分離、重組及/或融合至異源核苷酸序列或來自DNA庫。

在其他實施例中，用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIA多肽的核酸可包括在高度嚴格條件下雜交成SEQ ID NO:4或5中指定之核苷酸序列、SEQ ID NO:4或5之補體序列或其片段之核苷酸序列。一般熟習此項技術者應理解可改變促進DNA雜交之合適嚴格度條件。舉例而言，吾人可在約攝氏45度下在6.0 ×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)下進行雜交，接著在攝氏50度下進行2.0 × SSC之洗滌。舉例而言，洗滌步驟中之鹽濃度可選自在攝氏50度下約2.0 × SSC之低嚴格度至在攝氏50度下約0.2 × SSC之高嚴格度。此外，洗滌步驟中之溫度可自在室溫(約攝氏22度)下之低嚴格度條件增加至在約攝氏65度下之高嚴格度條件。可改變溫度及鹽兩者，或溫度或鹽濃度可保持恆定，而改變另一變數。在一個實施例中，在室溫下在6 × SSC之低嚴格度條件下雜交，接著在室溫下在2 × SSC下洗滌之核酸可與本文所描述之方法及組合物一起使用。

由於基因密碼中之簡併不同於如SEQ ID NO:4或5中所闡述之核酸的分離核酸亦可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIA多肽。舉例而言，藉由一種以上三重態指定多種胺基酸。指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)

可引起不影響蛋白質之胺基酸序列之「靜默」突變。然而，吾人預期引起本發明蛋白質之胺基酸序列改變之DNA序列多形現象將存在於哺乳動物細胞中。熟習此項技術者將瞭解編碼特定蛋白質之核酸之一或多種核苷酸(多達約3-5%之核苷酸)之此等變異可由於天然對偶基因變異存在於給定物種之個體中。

在某些實施例中，重組核酸可操作地連接於表現構築體中之一或多個調節核苷酸序列。調節核苷酸序列將一般適合於用於表現之宿主細胞。對於多種宿主細胞，此項技術中已知許多類型之合適表現載體及適合調節序列。通常該一或多個調節核苷酸序列可包括(但不限於)啟動子序列、前導或信號序列、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因子序列。本文中涵蓋如此項技術中已知之組成性或誘導性啟動子。啟動子可為天然存在之啟動子，或組合一種以上啟動子之元件之雜合啟動子。表現構築體可存在於細胞中游離基因體(諸如質體)上，或表現構築體可插入染色體中。在一較佳實施例中，表現載體含有可選擇標記基因以允許選擇經轉型宿主細胞。可選擇標記基因為此項技術中熟知且將隨使用之宿主細胞變化。

在某些態樣中，用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIA多肽之核酸可提供於包含編碼ActRIIA多肽之核苷酸序列且可操作地連接於至少一種調節序列的表現載體中。調節序列為此項技術中公認的且經選擇以引導ActRIIA多肽之表現。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, Calif. (1990)中。舉例而言，當可操作地連接於DNA序列時控制其表現之廣泛多種表現控制序列中之任一者可在此等載體中使用以表現編碼ActRIIA多肽之DNA序列。此等適用之

表現控制序列包括例如SV40之早期及晚期啟動子、tet啟動子、腺病毒或細胞巨大病毒立即早期啟動子、RSV啟動子、lac系統、trp系統、TAC或TRC系統、表現藉由T7核糖核酸聚合酶導引之T7啟動子、噬菌體λ之主要操縱子及啟動子區域、fd鞘蛋白之控制區域、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖分解酶之啟動子、酸性磷酸酶之啟動子(例如Pho5)、酵母α-交配因子之啟動子、桿狀病毒系統及已知控制原核或真核細胞或其病毒基因之表現之其他序列的多面體啟動子及其各種組合。應理解表現載體之設計可視諸如欲轉型之宿主細胞之選擇及/或需要表現之蛋白質之類型的因素而定。此外，亦應考慮載體之複本數、控制該複本數之能力及藉由載體(諸如抗生素標記)編碼之任何其他蛋白質之表現。

用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIA多肽的重組核酸可藉由將選殖基因或其部分接合至適用於在原核細胞、真核細胞(酵母、禽類、昆蟲或哺乳動物)或兩者中表現之載體中產生。用於產生重組ActRIIA多肽之表現載體包括質體及其他載體。舉例而言，適合載體包括以下類型之質體：pBR322衍生之質體、pEMBL衍生之質體、pEX衍生之質體、pBTac衍生之質體及pUC衍生之質體，其用於在原核細胞，諸如大腸桿菌中表現。

一些哺乳動物表現載體含有促進載體在細菌中繁殖之原核序列及在真核細胞中表現之一或多個真核轉錄單元兩者。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及pHyg衍生之載體為適用於轉染真核細胞之哺乳動物表現載體之實例。此等載體中之一些用來自細菌質體，諸如pBR322之序列修飾以促進在原核細胞及真核細胞中複製及抗藥性選擇。替代地，諸如牛乳頭狀瘤病毒(BPV-1)或埃-巴二氏病毒(pHEBo、pREP衍生及p205)之病毒衍生物可用於蛋白質在真核細胞

中之短暫表現。其他病毒(包括反轉錄病毒)表現系統之實例可以下見於基因療法遞送系統之描述中。質體之製備及宿主生物體之轉型中使用之各種方法在此項技術中熟知。關於原核及真核細胞之其他適合表現系統以及一般重組程序，參見Sambrook、Fritsch及Maniatis編之Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第3版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在一些情況下，可能需要藉由使用桿狀病毒表現系統表現重組多肽。此等桿狀病毒表現系統之實例包括pVL衍生之載體(諸如pVL1392、pVL1393及pVL941)、pAcUW衍生之載體(諸如pAcUW1)及pBlueBac衍生之載體(諸如含有β-gal之pBlueBac III)。

載體可經設計以便在CHO細胞，諸如Pcmv-Script載體(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4載體(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)及pCI-neo載體(Promega, Madison, Wis.)中產生本發明ActRIIA多肽。如將顯而易見，本發明基因構築體可用於引起本發明ActRIIA多肽在於培養物中繁殖之細胞中表現例如以產生蛋白質，包括融合蛋白或變異蛋白，以便純化。

用包括用於本發明ActRIIA多肽中之一或多者之編碼序列(例如SEQ ID NO:4或5)的重組基因轉染之宿主細胞可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIA多肽。宿主細胞可為任何原核或真核細胞。舉例而言，本文提供之ActRIIA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。其他適合之宿主細胞為熟習此項技術者已知。

因此，本文提供產生ActRIIA多肽之方法。舉例而言，用編碼ActRIIA多肽之表現載體轉染之宿主細胞可在合適條件下培養以允許ActRIIA多肽之表現發生。ActRIIA多肽可自含有ActRIIA多肽之細胞與培養基之混合物分泌及分離。替代地，ActRIIA多肽可以細胞質方式或在膜部分中保留且收集細胞，溶解且分離蛋白質。細胞培養物包

括宿主細胞、培養基及其他副產物。用於細胞培養之適合培養基在此項技術中熟知。本發明ActRIIA多肽可使用此項技術中已知之用於純化蛋白質之技術自細胞培養基、宿主細胞或兩者分離，該等技術包括離子交換層析、凝膠過濾層析、超過濾、電泳、用對ActRIIA多肽之特定抗原決定基具有特異性之抗體免疫親和純化及用結合至與ActRIIA多肽融合之結構域之試劑親和純化(例如蛋白A管柱可用於純化ActRIIA-Fc融合物)。在一較佳實施例中，ActRIIA多肽為含有促進其純化之結構域的融合蛋白。在一個實施例中，純化藉由一系列管柱層析步驟實現，該等步驟以任何順序包括例如以下中之三者或三者以上：蛋白質A層析、Q瓊脂糖層析、苯基瓊脂糖層析、尺寸排外層析及陽離子交換層析。純化可用病毒過濾及緩衝液更換完成。如本文中所展現，將ActRIIA-hFc蛋白質純化至如藉由尺寸排外層析所測定之>98%及如藉由SDS PAGE所測定之>95%之純度。此純度水準足以實現對小鼠中之骨骼之所需影響及在小鼠、大鼠及非人類靈長類動物中之可接受安全概況。

在另一實施例中，針對純化前導序列，諸如在重組ActRIIA多肽之所需部分之N端處的聚-(His)/腸激酶裂解位點序列編碼之融合基因可允許藉由使用Ni^{2+}金屬樹脂之親和性層析純化表現之融合蛋白。純化前導序列可隨後藉由用腸激酶處理來隨後移除以提供純化ActRIIA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吾人所熟知。基本上，針對不同多肽序列編碼之各種DNA片段之接合根據習知技術進行，其使用用於連接之鈍端或交錯端末端、提供合適末端之限制酶消化、按需要黏端之填充、避免非所需接合之鹼性磷酸酶處理及酶促連接。在另一實施例中，融合基因可藉由包括自動DNA合成器之習知技術合成。替代地，

基因片段之PCR擴增可使用錨定引子進行，該等錨定引子在可隨後黏接以產生嵌合基因序列之兩個連續基因片段之間產生互補突出物(參見例如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等人編, John Wiley & Sons: 1992)。

ActRIIA-Fc融合蛋白可在來自pAID4載體(SV40 ori/強化子，CMV啟動子)之穩定轉染CHO-DUKX Bl 1細胞中使用SEQ ID NO:9之組織纖維蛋白溶酶原前導序列表現。Fc部分為如SEQ ID NO:7中所示之人類IgG1 Fc序列。在某些實施例中，在表現後，含有之蛋白質平均具有每分子ActRIIA-Fc融合蛋白，在約1.5與2.5莫耳之間的唾液酸。

在某些實施例中，ActRIIA-Fc融合物之長血清半衰期可為在人類個體中25-32天。另外，CHO細胞表現物質可具有比針對在人類293細胞中表現之ActRIIA-hFc融合蛋白報導之親和力高的對活化素B配位體之親和力(del Re等人, J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35)。另外，不受理論束縛，使用TPA前導序列提供比其他前導序列大之產量，且不同於用天然前導序列表現之ActRIIA-Fc，可提供高度純之N端序列。使用天然前導序列可產生ActRIIA-Fc之各具有不同N端序列之兩個主要物種。

1.5.2 ACTRIIB信號傳導抑制劑

如本文所用，術語「ActRIIB」係指來自任何物種之活化素受體IIB型(ActRIIB)蛋白質之家族及藉由突變誘發或其他修飾衍生自此等ActRIIB蛋白質之變異體。本文中提及ActRIIB理解為提及受體之目前鑑定形式中之任一者。ActRIIB家族之成員一般為跨膜蛋白，其由以下構成：具有富含半胱胺酸之區域之配位體結合細胞外結構域、跨膜結構域及具有預測絲胺酸/蘇胺酸激酶活性之細胞質結構域。

欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑

包括(但不限於)活化素結合之可溶ActRIIB多肽、結合至活化素(尤其活化素A或B子單元，亦稱為β_A或β_B)且破壞ActRIIB結合之抗體、結合至ActRIIB且破壞活化素結合之抗體、針對活化素或ActRIIB結合選擇之非抗體蛋白及針對活化素或ActRIIB結合選擇之可結合至Fc結構域之隨機化肽。

在某些實施例中，具有活化素或ActRIIB結合活性之兩種或兩種以上不同蛋白質(或其他部分)，尤其分別阻斷I型(例如可溶I型活化素受體)及II型(例如可溶II型活化素受體)結合位點之活化素結合子可一起連接以產生抑制ActRIIB且因此可用於包括之本文所描述之組合物及方法中之雙官能或多官能結合分子。在某些實施例中，抑制ActRIIB之活化素-ActRIIB信號傳導軸拮抗劑包括核酸適體，包括用於本文所描述之組合物及方法中之小分子及其他試劑。

1.5.2.1包含ActRIIB多肽之ActRIIB信號傳導抑制劑

如本文所用，術語「ActRIIB多肽」係指包含ActRIIB家族成員之任何天然存在之多肽以及保留適用活性之其任何變異體(包括突變體、片段、融合物及肽模擬物形式)的多肽。舉例而言，ActRIIB多肽包括衍生自具有與ActRIIB多肽序列至少約80%一致，且視情況至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上一致性之序列的任何已知ActRIIB受體序列的多肽。舉例而言，ActRIIB多肽可結合至ActRIIB蛋白及/或活化素且抑制ActRIIB蛋白及/或活化素之功能。ActRIIB多肽之實例包括人類ActRIIB前驅體多肽(SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28)。關於胺基酸序列描述為SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之ActRIIB前驅體多肽(亦即人類ActRIIB前驅體多肽)，ActRIIB前驅體多肽之信號肽位於胺基酸1至18處；細胞外結構域位於胺基酸19至134處且可能之N連接糖基化位點位於胺基酸位置42及65處。編碼SEQ ID NO:16之人類ActRIIB前驅體多肽之核酸序列揭示為SEQ ID

NO:19 (SEQ ID NO:19在對應於胺基酸位置64之密碼子處提供丙胺酸，但替代地可容易地由熟習此項技術者使用此項技術中已知之方法修飾以在對應於胺基酸位置64之密碼子處提供精胺酸)。關於序列之描述參見表21。

除非另外特定指明，否則本文所描述之所有ActRIIB相關多肽之胺基酸之編號係基於SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:28 (其僅僅在於位置64表現之胺基酸方面不同)之胺基酸編號。舉例而言，若ActRIIB多肽描述為在胺基酸位置79具有取代/突變，則應理解位置79係指衍生ActRIIB多肽之SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28中之第79個胺基酸。同樣地，若ActRIIB多肽描述為在胺基酸位置64具有丙胺酸或精胺酸，則應理解位置64係指衍生ActRIIB多肽之SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28中之第64個胺基酸。

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含具有ActRIIB之活化素結合結構域之多肽。在一些實施例中，ActRIIB之活化素結合結構域包含ActRIIB之細胞外結構域或其部分。在特定實施例中，ActRIIB之細胞外結構域或其部分可溶。ActRIIB多肽之說明性修飾形式揭示於美國專利申請公開案第20090005308號及第20100068215號中，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

在特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB多肽為可溶ActRIIB多肽。術語「可溶ActRIIB多肽」一般係指包含ActRIIB蛋白之細胞外結構域，包括ActRIIB蛋白之任何天然存在之細胞外結構域之多肽以及其任何變異體(包括突變體、片段及肽模擬物形式)。可溶ActRIIB多肽可結合至活化素；然而，相對於GDF8/11，野生型ActRIIB蛋白不展示在結合至活化素方面之顯著選擇性。在某些實施例中，具有不同結合特性之變化形式之ActRIIB可用於本文所

提供之方法中。此等變化形式揭示於例如國際專利申請公開案第WO 2006/012627號及第WO 2010/019261號中，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。可藉由使天然或變化ActRIIB蛋白與第二活化素選擇性結合劑偶合來給與其對活化素之附加特異性。例示性可溶ActRIIB多肽包括人類ActRIIB多肽(例如SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43)之細胞外結構域。

具有Hilden等人(Blood, 1994, 83(8):2163-70)揭示之在對應於ActRIIB前驅體胺基酸序列，亦即SEQ ID NO:16之胺基酸64 (本文中稱為「A64」)之位置處具有丙胺酸之ActRIIB細胞外序列的Fc融合蛋白已經展現具有對活化素及GDF-11之相對低親和力。相比之下，在ActRIIB前驅體胺基酸序列之位置64 (本文中稱為「R64」)處具有精胺酸之Fc融合蛋白具有在低奈莫耳至高皮莫耳範圍內之對活化素及GDF-11之親和力(參見例如美國專利申請公開案第20100068215號，其揭示內容全部併入本文中)。在位置64具有精胺酸之ActRIIB前驅體胺基酸序列呈現在SEQ ID NO:28中。因而，在某些實施例中，根據本文所描述之組合物及方法使用之ActRIIB多肽可包含(i)在對應於ActRIIB前驅體胺基酸序列，亦即SEQ ID NO:16之胺基酸64之位置處的丙胺酸；或(ii)在ActRIIB前驅體胺基酸序列，亦即SEQ ID NO:28之位置64處的精胺酸。在其他實施例中，根據本文所描述之組合物及方法使用之ActRIIB多肽可包含不為在對應於ActRIIB前驅體胺基酸序列，亦即SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸64之位置處之丙胺酸或精胺酸的胺基酸。

已顯示在ActRIIB之細胞外結構域之C端刪除脯胺酸節降低受體對活化素之親和力(參見例如Attisano等人, Cell, 1992, 68(1):97-108)。含有SEQ ID NO:28之胺基酸20-119之ActRIIB-Fc融合蛋白(亦即SEQ ID NO:32)「ActRIIB(20-119)-Fc」相對於包括脯胺酸節區域及完整近

膜結構域之含有SEQ ID NO:28之胺基酸20-134之ActRIIB-Fc融合蛋白(亦即SEQ ID NO:31)「ActRIIB(20-134)-Fc」，具有降低之與GDF-11及活化素之結合。然而，含有SEQ ID NO:28之胺基酸20-129之ActRIIB-Fc融合蛋白「ActRIIB(20-129)-Fc」相對於ActRIIB之未截短細胞外結構域保留類似但略微降低之活性，儘管脯胺酸節區域經破壞。因此，包含在SEQ ID NO:28 (或SEQ ID NO:16)之胺基酸134、133、132、131、130及129處終止之細胞外結構域之ActRIIB多肽均預期為活性，但在胺基酸134或133處終止之構築體可為活性最強。類似地，在殘基129-134中之任一者處之突變不預期以較大限度改變配位體結合親和力，如藉由SEQ ID NO:28之P129及P130之突變不實質上減少配位體結合之事實所指示。因此，根據本文所描述之方法及組合物使用之ActRIIB多肽可早在SEQ ID NO:28 (或SEQ ID NO:16)之胺基酸109 (亦即最終半胱胺酸)結束，然而在SEQ ID NO:28 (或SEQ ID NO:16)之胺基酸位置109及119處或之間結束之形式預期具有降低之配位體結合能力。

SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:28之胺基酸29代表ActRIIB前驅體序列中之初始半胱胺酸。吾人預期在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之N端之胺基酸29處或在此等胺基酸位置之前開始之ActRIIB多肽將保留配位體結合活性。在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之位置24處之丙胺酸至天冬醯胺突變在不實質上影響配位體結合之情況下引入N連接糖基化序列。此確認對應於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-29之在信號裂解肽與半胱胺酸交聯區域之間的區域中之突變充分耐受。特定言之，在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置20、21、22、23及24處開始之ActRIIB多肽將保留活性，且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置25、26、27、28及29處開始之ActRIIB多肽亦預期保留活性。在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺

基酸位置22、23、24或25處開始之ActRIIB多肽將具有最大活性。

綜合而言，欲根據本文所描述之方法及組合物使用之ActRIIB前驅蛋白(亦即SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28)之活性部分(亦即ActRIIB多肽)將一般包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸29-109，且此等ActRIIB多肽可例如在對應於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸19-29中之任一者之殘基處開始且在對應於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸109-134中之任一者之位置處結束。本文涵蓋之ActRIIB多肽之特定實例包括在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之19-29、20-29或21-29之胺基酸位置處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之119-134、119-133或129-134、129-133之胺基酸位置處結束之彼等多肽。本文涵蓋之ActRIIB多肽之其他特定實例包括在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之20-24 (或21-24或22-25)之胺基酸位置處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之109-134 (或109-133)、119-134 (或119-133)或129-134 (或129-133)之胺基酸位置處結束之彼等多肽。亦涵蓋屬於此等範圍內之變異ActRIIB多肽，尤其與SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之對應部分具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性或序列同源性之彼等多肽。

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含ActRIIB之細胞外結構域之截短形式。截短可在ActRIIB多肽之羧基端及/或胺基端處。在某些實施例中，相對於成熟ActRIIB多肽細胞外結構域，截短可為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個胺基酸長。在某些實施例中，截短可為成熟ActRIIB多肽細胞外結構域之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個N端胺基酸。在某些實

施例中，截短可為成熟ActRIIB多肽細胞外結構域之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個C端胺基酸。舉例而言，ActRIIB之截短形式包括具有胺基酸20-119、20-128、20-129、20-130、20-131、20-132、20-133、20-134、20-131、21-131、22-131、23-131、24-131及25-131之多肽，其中胺基酸位置指在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28中之胺基酸位置。

ActRIIB之額外例示性截短形式包括(i)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸21-29中之任一者處開始(視情況在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之22-25處開始)且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸109-134中之任一者處結束之多肽；(ii)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-29中之任一者處開始(視情況在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之22-25處開始)且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸109-133中之任一者處結束之多肽；(iii)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-24中之任一者處開始(視情況在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之22-25處開始)且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸109-133中之任一者處結束之多肽；(iv)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸21-24中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸109-134中之任一者處結束之多肽；(v)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-24中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸118-133中之任一者處結束之多肽；(vi)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸21-24中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸118-134中之任一者處結束之多肽；(vii)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-24中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸128-133中之任一者處結束之多肽；(viii)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之

胺基酸20-24中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸128-133中之任一者處結束之多肽；(ix)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸21-29中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸118-134中之任一者處結束之多肽；(x)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-29中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸118-133中之任一者處結束之多肽；(xi)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸21-29中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸128-134中之任一者處結束之多肽；及(xii)在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸20-29中之任一者處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸128-133中之任一者處結束之多肽。在一特定實施例中，ActRIIB多肽包含在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置25處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置131處結束之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在另一特定實施例中，ActRIIB多肽由SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42或43之胺基酸序列組成或基本上由該胺基酸序列組成。

用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB多肽中之任一者可以均二聚體形式產生。用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB多肽中之任一者可以具有包含來自IgG重鏈之恆定區(諸如Fc結構域)之異源部分的融合蛋白形式調配。用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB多肽中之任一者可包含在對應於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之位置79之位置處的酸性胺基酸視情況與一或多個相對於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之額外胺基酸取代、刪除或插入之組合。

在特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含具有一或多個胺基酸取代/突變之ActRIIB之細胞

外結構域。此類胺基酸取代/突變可為例如自SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置79處之白胺酸交換為酸性胺基酸，諸如天冬胺酸或麩胺酸。舉例而言，SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之位置L79可在ActRIIB細胞外結構域多肽中改變以賦予改變之活化素-肌肉抑制素(GDF-11)結合特性。與活化素結合相比，L79A及L79P突變在更大程度上減少GDF-11結合。L79E及L79D突變仍保留GDF-11結合，然而展現極大減少之活化素結合。

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含亦攜帶胺基酸取代(例如自SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置79處之白胺酸交換為酸性胺基酸，諸如天冬胺酸或麩胺酸)之ActRIIB細胞外結構域之截短形式。在一特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之亦攜帶胺基酸取代之ActRIIB多肽之細胞外結構域的截短形式為SEQ ID NO:23。截短及/或攜帶一或多個胺基酸取代之ActRIIB之形式可連接至如上文所論述之抗體之Fc結構域。

ActRIIB多肽之功能活性片段可例如藉由篩選以重組方式由編碼ActRIIB多肽之核酸之對應片段產生之多肽獲得。此外，片段可使用此項技術中已知之技術，諸如習知梅里菲爾德固相f-Moc或t-Boc化學方法來化學合成。如熟習此項技術者將認識到其他技術，包括例如用於肽合成之各種樹脂及溶液相系統可用於合成本文所描述之肽基片段。片段可經產生(以重組方式或藉由化學合成)且測試以鑑定可充當ActRIIB蛋白或藉由活化素介導之信號傳導之拮抗劑(抑制劑)的彼等肽基片段。

此外，ActRIIB多肽之功能活性變異體可例如藉由篩選以重組方式由編碼ActRIIB多肽之對應誘變核酸產生之修飾多肽庫獲得。變異體可經產生且測試以鑑定可充當ActRIIB蛋白或藉由活化素介導之信

號傳導之拮抗劑(抑制劑)之彼等者。在某些實施例中，ActRIIB多肽之功能變異體包含與選自SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之胺基酸序列至少75%一致之胺基酸序列。在某些實施例中，功能變異體具有與選自SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列。

功能變異體可例如藉由出於諸如增強治療功效或穩定性(例如離體存放期及活體內對蛋白水解降解之耐受性)的目的修飾ActRIIB多肽之結構產生。當經選擇以保留活化素結合時將此類修飾ActRIIB多肽認為天然存在之ActRIIB多肽之功能等效物。修飾ActRIIB多肽亦可例如藉由胺基酸取代、刪除或添加產生。舉例而言，期望用異白胺酸或纈胺酸獨立置換白胺酸、用麩胺酸鹽置換天冬胺酸鹽、用絲胺酸置換蘇胺酸或用結構上相關胺基酸類似置換胺基酸(例如保守性突變)將不對所得分子之生物活性具有主要影響為合理的。保守性置換為在其側鏈中相關之胺基酸家族內進行的彼等置換。ActRIIB多肽之胺基酸序列變化是否產生功能同源物可容易地藉由評估變異ActRIIB多肽以類似於野生型ActRIIB多肽之方式在細胞中產生反應之能力確定。

ActRIIB多肽突變體，尤其ActRIIB多肽之組合突變體組，以及截短突變體；組合突變體池尤其適用於鑑定可用於本文所描述之方法及組合物中之功能變異體序列。篩選此等組合庫之目的可為產生例如可充當促效劑或拮抗劑，或替代地一起具有新穎活性之ActRIIB多肽變異體。

已展現ActRIIB之配位體結合袋藉由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之殘基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限定。在此等位置處，吾人預期保守性突變將耐受，儘管K74A突變充分耐受，如同在位置L79處之R40A、K55A、F82A及突變。R40為非洲爪蟾屬(Xenopus)中之K，指示此位置處之鹼性胺基酸將耐受。Q53為牛ActRIIB中之R及非洲爪蟾屬ActRIIB中之K，且因此包括R、K、Q、N及H之胺基酸將在此位置處耐受。因此，用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB多肽之通式為包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸29-109，但視情況在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之20-24或22-25範圍內之胺基酸位置處開始且在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之129-134範圍內之胺基酸位置處結束，且在配位體結合袋中包含不超過1、2、5或15個保守性胺基酸變化及在配位體結合袋中在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸位置40、53、55、74、79及/或82處包含零、一或多個非保守性變化之通式。此類ActRIIB多肽可保留與SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸29-109之序列的大於80%、90%、95%或99%序列一致性或序列同源性。變異性可尤其充分耐受之在結合袋外之位點包括ActRIIB之細胞外結構域之胺基及羧基端及位置42-46及65-73。在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之位置65處之天冬醯胺至丙胺酸改變(N65A)實際上改良在A64背景中之配位體結合，且因此預期對R64背景中之配位體結合不具有有害影響。此變化可能消除在A64背景中在N65處之糖基化，因此展現可能耐受此區域中之顯著變化。雖然R64A變化經不佳地耐受，R64K經充分耐受，且因此另一鹼性殘基，諸如H可能在位置64處耐受。

作為在配位體結合結構域中具有突變之ActRIIB多肽之一特定實例，ActRIIB之配位體結合結構域之帶正電荷胺基酸殘基Asp (D80)可突變成不同胺基酸殘基以使得變異ActRIIB多肽優先結合至GDF8而非活化素。在一特定實施例中，使D80殘基變為選自由以下組成之群的

胺基酸殘基：不帶電胺基酸殘基、負性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可變為酸性胺基酸天冬胺酸或麩胺酸以極大地減少活化素結合同時保留GDF11結合。如熟習此項技術者將認識到，大多數所描述之突變、變異或修飾可在核酸水準下或在一些情況下，藉由轉譯後修飾或化學合成進行。此等技術在此項技術中熟知。

在特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含結合物/融合蛋白，該結合物/融合蛋白包含連接至抗體之Fc部分的ActRIIB受體之細胞外結構域(例如活化素結合結構域)。此等結合物/融合蛋白可包含本文所揭示之ActRIIB多肽中之任一者(例如SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42或43中之任一者)、此項技術中已知之任何ActRIIB多肽或使用此項技術中已知之方法產生及/或本文提供之任何ActRIIB多肽。

在某些實施例中，細胞外結構域經由連接子，例如肽連接子連接至抗體之Fc部分。例示性連接子包括短多肽序列，諸如2-10、2-5、2-4、2-3個胺基酸殘基(例如甘胺酸殘基)，諸如Gly-Gly-Gly連接子。在一特定實施例中，連接子包含胺基酸序列Gly-Gly-Gly (GGG)。在另一特定實施例中，連接子包含胺基酸序列Thr-Gly-Gly-Gly (TGGG)。視情況，Fc結構域在殘基處具有一或多種突變，諸如Asp-265、離胺酸322及Asn-434。在某些情況下，具有此等突變中之一或多者(例如Asp-265突變)之突變Fc結構域相對於野生型Fc結構域，結合至Fcγ受體之能力降低。在其他情況下，具有此等突變中之一或多者(例如Asn-434突變)之突變Fc結構域相對於野生型Fc結構域，結合至MHC I類相關Fc受體(FcRN)之能力增加。包含融合至Fc結構域之ActRIIB之可溶細胞外結構域的例示性融合蛋白闡述於SEQ ID NO:20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46及47中。

在一特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含連接至抗體之Fc部分的ActRIIB之細胞外結構域或其部分，其中該ActRIIB信號傳導抑制劑包含與選自SEQ ID NO:20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46及47之胺基酸序列至少75%一致的胺基酸序列。在另一特定實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑包含連接至抗體之Fc部分的ActRIIB之細胞外結構域或其部分，其中該ActRIIB信號傳導抑制劑包含與選自SEQ ID NO:20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46及47之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

在一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑為人類ActRIIB受體之細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白。在另一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑為人類ActRIIB受體之截短細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白。在另一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑為人類ActRIIB受體之截短細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白，其中人類ActRIIB受體之截短細胞外結構域擁有在對應於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸79之胺基酸位置處的胺基酸取代。在一個實施例中，在對應於SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸79之胺基酸位置處的胺基酸取代為用白胺酸取代天冬胺酸(亦即L79D突變)。

在一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑為SEQ ID NO:24或25，其表示人類ActRIIB受體之細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白，其中該ActRIIB細胞外結構域包含具有L79D突變之SEQ ID NO:28之胺基酸25-131。

編碼SEQ ID NO:24之ActRIIB-Fc融合蛋白之核酸序列呈現在SEQ ID NO:45中。

在另一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRIIB信號傳導抑制劑為SEQ ID NO:34或35，其表示人類ActRIIB受體之細胞外結構域與IgG1之Fc部分之間的融合蛋白，其中該ActRIIB細胞外結構域包含具有L79D突變之SEQ ID NO:16之胺基酸25-131。

天冬醯胺連接之糖基化識別位點一般包含藉由合適細胞糖基化酶特異性識別之三肽序列，天冬醯胺-X-蘇胺酸(或天冬醯胺-X-絲胺酸) (其中「X」為任何胺基酸)。改變亦可藉由添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或藉由一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代至野生型ActRIIB多肽之序列(對於O連接之糖基化位點)進行。在糖基化識別位點之第一或第三胺基酸位置中之一者或兩者處的多種胺基酸取代或刪除(及/或在第二位置處之胺基酸刪除)引起在修飾三肽序列處之非糖基化。增加ActRIIB多肽上碳水化合物部分之數目的另一方式為藉由醣苷與ActRIIB多肽之化學或酶促偶合。視使用之偶合模式而定，糖可連接至(a)精胺酸及組胺酸；(b)游離羧基；(c)游離硫氫基，諸如半胱胺酸之彼等硫氫基；(d)游離羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之彼等羥基；(e)芳族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之彼等殘基；或(f)麩醯胺酸之醯胺基。此等方法描述於1987年9月11日公開之國際專利申請案第WO 87/05330號及Aplin及Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306頁中，其以引用之方式併入本文中。存在於ActRIIB多肽上之一或多個碳水化合物部分之移除可以化學方式及/或以酶促方式實現。化學去糖基化可涉及例如使ActRIIB多肽暴露於化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此處理使得除連接糖(N-乙醯基葡萄胺糖或N-乙醯基半乳胺糖)外之大多數或所有糖裂解，而保持胺基酸序列完整。化學去糖基化由Hakimuddin等人, (1987) Arch.

Biochem. Biophys. 259:52及由Edge等人，(1981) Anal. Biochem. 118:131進一步描述。ActRIIB多肽上碳水化合物部分之酶促裂解可藉由使用如由Thotakura等人(1987) Meth. Enzymol. 138:350所描述之各種內醣苷酶及外醣苷酶來達成。ActRIIB多肽之序列可按需要視使用之表現系統類型而調整，因為哺乳動物、酵母、昆蟲及植物細胞可均引入可受肽之胺基酸序列影響之不同糖基化模式。一般而言，用於人類之ActRIIB蛋白將在提供適當糖基化之哺乳動物細胞株，諸如HEK293或CHO細胞株中表現，儘管其他表現系統，諸如其他哺乳動物表現細胞株、具有工程改造糖基化酶之酵母細胞株及昆蟲細胞預期同樣適用。

在特定實施例中，包含相對於ActRIIB (R64)-Fc形式，增加ActRIIB-Fc融合蛋白之血清半衰期的另一N連接糖基化位點(N-X-S/T)之添加之突變ActRIIB多肽可用於本文所描述之方法及組合物中。在一特定實施例中，在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之位置24處引入天冬醯胺(A24N)使得產生賦予較長半衰期之NXT序列。其他NX(T/S)序列可在42-44 (NQS)及65-67 (NSS)處發現，儘管後者可能用位置64處之R (亦即在R64多肽中)不有效地糖基化。N-X-S/T序列可一般在以上詳述之ActRIIB之配位體結合袋外的位置處引入。用於引入非內源N-X-S/T序列之尤其適合之位點包括SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28之胺基酸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或其他融合物組分之間的連接子中。此類位點可以最少努力藉由在相對於預先存在之S或T之正確位置中引入N或藉由在對應於預先存在之N之位置處引入S或T來引入。因此，將產生N連接之糖基化位點之所需變化為A24N、R64N、S67N(可能與N65A變化組合)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S及R112T (其中所有胺基酸位置對應於可在

SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28中發現其之位置)。由於糖基化提供之保護，預測待糖基化之任何S可在不產生免疫原性位點之情況下改變成T。同樣地，預測待糖基化之任何T可改變成S。因此本文中涵蓋改變S67T及S44T。同樣地，在A24N變異體中，可使用S26T改變。因此，ActRIIB多肽可包括一或多個額外、非內源N連接糖基化共同序列。

可使用多種篩選分析來評估ActRIIB多肽變異體。舉例而言，可針對結合至ActRIIB配位體、防止ActRIIB配位體與ActRIIB多肽之結合或干擾由ActRIIB配位體所引起之信號傳導之能力篩選ActRIIB多肽變異體。ActRIIB多肽或其變異體之活性亦可在基於細胞之分析或活體內分析中測試。

可產生相對於天然存在之ActRIIB多肽，具有選擇性或一般增加之效能的組合衍生變異體。同樣地，突變誘發可產生具有與對應野生型ActRIIB多肽顯著不同之細胞內半衰期之變異體。舉例而言，可使改變之蛋白質對蛋白水解降解或導致天然ActRIIB多肽之破壞或者失活之其他細胞過程較穩定或較不穩定。此等變異體及編碼其之基因可用於藉由調節ActRIIB多肽之半衰期改變ActRIIB多肽水準。舉例而言，短半衰期可產生更短暫生物影響且可允許較緊密控制個體內之重組ActRIIB多肽水準。在Fc融合蛋白中，突變可在連接子(若存在)及/或Fc部分中進行以改變蛋白質之半衰期。

組合庫可藉助於編碼各包括至少一部分可能ActRIIB多肽序列之多肽庫之基因之簡併庫產生。舉例而言，可將合成寡核苷酸之混合物以酶促方式接合至基因序列中以使得簡併組之可能ActRIIB多肽核苷酸序列可作為個別多肽，或替代地作為一組較大融合蛋白(例如用於噬菌體呈現)表現。

存在許多可由簡併寡核苷酸序列產生可能同源物庫之方式。簡

併基因序列之化學合成可在自動DNA合成器中進行，且合成基因隨後接合至合適載體中以便表現。簡併寡核苷酸之合成在此項技術中眾所周知(參見例如Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3；Itakura等人, (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton編, Amsterdam: Elsevier 第273-289頁；Itakura等人, (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323；Itakura等人, (1984) Science 198:1056：Ike等人, (1983) Nucleic Acid Res. 11:477)。此等技術已經用於其他蛋白質之定向進化(參見例如Scott等人, (1990) Science 249:386-390；Roberts等人, (1992) PNAS USA 89:2429-2433；Devlin等人, (1990) Science 249: 404-406；Cwirla等人, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382；以及美國專利第5,223,409號、第5,198,346號及第5,096,815號)。

或者，可利用其他形式之突變誘發產生組合庫。舉例而言，ActRIIB多肽變異體可藉由使用例如丙胺酸掃描突變誘發及其類似技術篩選(Ruf等人, (1994) Biochemistry 33:1565-1572；Wang等人, (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099；Balint等人, (1993) Gene 137:109-118；Grodberg等人, (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601；Nagashima等人, (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892；Lowman等人, (1991) Biochemistry 30:10832-10838；及Cunningham等人, (1989) Science 244:1081-1085)、藉由連接子掃描突變誘發(Gustin等人, (1993) Virology 193:653-660；Brown等人, (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652；McKnight等人, (1982) Science 232:316)、藉由飽和突變誘發(Meyers等人, (1986) Science 232:613)、藉由PCR突變誘發(Leung等人, (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19)或藉由隨機突變誘發，包括化學突變誘發等(Miller等人, (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.；及Greener

等人, (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)產生及自庫分離。連接子掃描突變誘發(尤其在組合設置中)為鑑定截短(生物活性)形式之ActRIIB多肽之有吸引力的方法。

此項技術中已知各種用於篩選藉由點突變及截短製造之組合庫之基因產物，且就此而言用於針對具有某一特性之基因產物篩選cDNA庫的技術。此類技術將一般適合於快速篩選藉由ActRIIB多肽之組合突變誘發產生之基因庫。篩選較大基因庫之最廣泛使用之技術通常包含將基因庫選殖至可複製表現載體中，用所得載體庫轉型合適細胞，且在所需活性之偵測促進編碼產物經偵測之基因之載體之相對容易分離的條件下表現組合基因。較佳分析包括活化素結合分析及活化素介導之細胞信號傳導分析。

在某些實施例中，用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB多肽除天然存在於ActRIIB多肽中之任何修飾以外，可進一步包含轉譯後修飾。此類修飾包括(但不限於)乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂質化及醯化。因此，經修飾ActRIIB多肽可含有非胺基酸要素，諸如聚乙二醇、脂質、多醣或單醣及磷酸鹽。此等非胺基酸要素對ActRIIB多肽之功能性之影響可藉由熟習此項技術者已知之任何方法測試。當ActRIIB多肽在細胞中藉由裂解新生形式之ActRIIB多肽產生時，轉譯後處理亦可對於蛋白質之正確摺疊及/或功能重要。不同細胞(諸如CHO、HeLa、MDCK、293、W138、NIH-3T3或HEK293)對於此等轉譯後活性具有特定細胞機制及特徵機制且可經選擇以確保ActRIIB多肽之正確修飾及處理。

在某些態樣中，ActRIIB多肽之功能變異體或修飾形式包括具有至少一部分ActRIIB多肽及一或多個融合結構域之融合蛋白。此等融合結構域之熟知實例包括(但不限於)聚組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽S轉移酶(GST)、硫氧還原蛋白、蛋白質A、蛋白質G、免疫球蛋白重鏈

恆定區(Fc)、麥芽糖結合蛋白(MBP)或人類血清白蛋白。融合結構域可經選擇以便賦予所需特性。舉例而言，一些融合結構域特別適用於藉由親和性層析法分離融合蛋白。出於親和純化之目的，使用用於親和性層析法之相關基質，諸如麩胱甘肽、澱粉酵素及鎳或鈷結合樹脂。許多此等基質可以「套組」形式獲得，諸如對(HIS_6)融合搭配物適用之Pharmacia GST純化系統及QIAexpressTM系統(Qiagen)。作為另一實例，融合結構域可經選擇以便促進ActRIIB多肽之偵測。此等偵測結構域之實例包括各種螢光蛋白質(例如GFP)以及「抗原決定基標籤」，其通常為特異性抗體可用之短肽序列。特異性單株抗體容易可用之熟知抗原決定基標籤包括FLAG、流感病毒血球凝集素(HA)及c-myc標籤。在一些情況下，融合結構域具有蛋白酶裂解位點(諸如用於因子Xa或凝血酶)，其允許相關蛋白酶部分消化融合蛋白且藉此自其釋放重組蛋白。釋放之蛋白質可隨後藉由隨後層析分離自融合結構域分離。在某些較佳實施例中，ActRIIB多肽與活體內穩定ActRIIB多肽之結構域(「穩定劑」結構域)融合。「穩定」意謂增加血清半衰期，不論此是否由於破壞減少、腎臟清除率降低或其他藥物動力學影響之任何者。與免疫球蛋白之Fc部分融合已知賦予各種蛋白質所需藥物動力學特性。同樣地，與人類血清白蛋白融合可賦予所需特性。可選擇之其他類型之融合結構域包括多聚化(例如二聚、四聚)結構域及功能結構域(賦予額外生物功能，諸如視需要進一步刺激骨骼生長或肌肉生長)。

應瞭解融合蛋白之不同要素可以符合所需功能性之任何方式配置。舉例而言，ActRIIB多肽可針對異源結構域經置放C端，或替代地異源結構域可針對ActRIIB多肽經置放C端。ActRIIB多肽結構域及異源結構域在融合蛋白中無需相鄰，且額外結構域或胺基酸序列可經包括C端或N端至任一結構域或結構域之間。

在某些實施例中，用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB多肽含有一或多種能夠穩定ActRIIB多肽之修飾。舉例而言，此等修飾增強ActRIIB多肽之活體外半衰期，增強ActRIIB多肽之循環半衰期或減少ActRIIB多肽之蛋白水解降解。此等穩定修飾包括(但不限於)融合蛋白(包括例如包含ActRIIB多肽及穩定劑結構域之融合蛋白)、修飾糖基化位點(包括例如添加糖基化位點至ActRIIB多肽)及修飾碳水化合物部分(包括例如自ActRIIB多肽移除碳水化合物部分)。在融合蛋白之情況下，ActRIIB多肽融合至穩定劑結構域，諸如IgG分子(例如Fc結構域)。如本文所用，術語「穩定劑結構域」不僅指如在融合蛋白之情況下的融合結構域(例如Fc)，而且包括非蛋白質修飾(諸如碳水化合物部分)，或非蛋白質聚合物(諸如聚乙二醇)。

在某些實施例中，本文所描述之方法及組合物使用分離或純化ActRIIB多肽，亦即自可與本文所描述之方法及組合物一起使用之其他蛋白質分離或者實質上不含其他蛋白質之ActRIIB多肽。ActRIIB多肽將一般藉由自重組核酸表現產生。

在某些態樣中，用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB多肽藉由分離及/或重組核酸(包括本文所揭示之片段、功能變異體及融合蛋白)編碼。舉例而言，SEQ ID NO:19編碼天然存在之人類ActRIIB前驅體多肽。本發明核酸可為單股或雙股。此等核酸可為DNA或RNA分子。此等核酸可例如用於製造ActRIIB多肽之方法中或用作直接治療劑(例如在基因治療方法中)。

在某些態樣中，可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB多肽的核酸進一步理解為包括如下核酸：其為SEQ ID NO:19之變異體以及編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)之變異體。變異核苷酸序列包括相差一或多種核苷酸

取代、添加或刪除之序列，諸如對偶基因變異體。

在某些實施例中，可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIB多肽的分離或重組核酸序列與SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%一致。一般熟習此項技術者將瞭解與SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)互補之核酸序列及SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)之變異體可與本文所描述之方法及組合物一起使用。在其他實施例中，核酸序列可分離、重組及/或與異源核苷酸序列融合或在DNA庫中。

在其他實施例中，可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIB多肽的核酸包括在高度嚴格條件下雜交成SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)中指定之核苷酸序列、SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)之補體序列或其片段之核苷酸序列。一般熟習此項技術者應理解可改變促進DNA雜交之合適嚴格度條件。舉例而言，吾人可在約攝氏45度下在6.0 ×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)下進行雜交，接著在攝氏50度下進行2.0 × SSC之洗滌。舉例而言，洗滌步驟中之鹽濃度可選自在攝氏50度下約2.0 × SSC之低嚴格度至在攝氏50度下約0.2 × SSC 之高嚴格度。此外，洗滌步驟中之溫度可自在室溫(約攝氏22度)下之低嚴格度條件增加至在約攝氏65度下之高

嚴格度條件。可改變溫度及鹽兩者，或溫度或鹽濃度可保持恆定，而改變另一變數。在一個實施例中，在室溫下在6 × SSC之低嚴格度條件下雜交，接著在室溫下在2 × SSC下洗滌之核酸可與本文所描述之方法及組合物一起使用。

由於基因密碼之簡併不同於如SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸)中所列之核酸的分離核酸亦可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之多肽。舉例而言，藉由一種以上三重態指定多種胺基酸。指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)可引起不影響蛋白質之胺基酸序列之「靜默」突變。然而，吾人預期引起本發明蛋白質之胺基酸序列改變之DNA序列多形現象將存在於哺乳動物細胞中。熟習此項技術者將瞭解編碼特定蛋白質之核酸之一或多種核苷酸(多達約3-5%之核苷酸)之此等變異可由於天然對偶基因變異存在於給定物種之個體中。任何及所有此等核苷酸變異及所得胺基酸多形現象可與本文所描述之方法及組合物一起使用。

在某些實施例中，可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIB多肽的重組核酸可操作地連接於表現構築體中之一或多個調節核苷酸序列。調節核苷酸序列將一般適合於用於表現之宿主細胞。對於多種宿主細胞，此項技術中已知許多類型之合適表現載體及適合調節序列。通常該一或多個調節核苷酸序列可包括(但不限於)啟動子序列、前導或信號序列、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因子序列。如此項技術中已知之組成性或誘導性啟動子可與本文所描述之方法及組合物一起使用。啟動子可為天然存在之啟動子，或組合一種以上啟動子之元件之雜合啟動子。表現構築體可存在於細胞中游離基因體(諸如質體)上，

或表現構築體可插入染色體中。在一較佳實施例中，表現載體含有可選擇標記基因以允許選擇經轉型宿主細胞。可選擇標記基因為此項技術中熟知且將隨使用之宿主細胞變化。

在某些態樣中，可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIB多肽的核酸提供於包含編碼ActRIIB多肽之核苷酸序列且可操作地連接於至少一個調節序列的表現載體中。調節序列為此項技術中公認的且經選擇以引導ActRIIB多肽之表現。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, Calif. (1990)中。舉例而言，當可操作地連接於DNA序列時控制其表現之廣泛多種表現控制序列中之任一者可在此等載體中使用以表現編碼ActRIIB多肽之DNA序列。此等適用之表現控制序列包括例如SV40之早期及晚期啟動子、tet啟動子、腺病毒或細胞巨大病毒立即早期啟動子、RSV啟動子、lac系統、trp系統、TAC或TRC系統、表現藉由T7核糖核酸聚合酶引導之T7啟動子、噬菌體λ之主要操縱子及啟動子區域、fd鞘蛋白之控制區域、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖分解酶之啟動子、酸性磷酸酶之啟動子(例如Pho5)、酵母α-交配因子之啟動子、桿狀病毒系統及已知控制原核或真核細胞或其病毒基因之表現之其他序列的多面體啟動子及其各種組合。應理解表現載體之設計可視諸如欲轉型之宿主細胞之選擇及/或需要表現之蛋白質之類型的因素而定。此外，亦應考慮載體之複本數、控制該複本數之能力及藉由載體(諸如抗生素標記)編碼之任何其他蛋白質之表現。

重組核酸可藉由將選殖基因或其部分接合至適用於在原核細胞、真核細胞(酵母、禽類、昆蟲或哺乳動物)或兩者中表現之載體中來產生。用於產生重組ActRIIB多肽之表現載體包括質體及其他載

體。舉例而言，適合載體包括以下類型之質體：pBR322衍生之質體、pEMBL衍生之質體、pEX衍生之質體、pBTac衍生之質體及pUC衍生之質體，其用於在原核細胞，諸如大腸桿菌中表現。

一些哺乳動物表現載體含有促進載體在細菌中繁殖之原核序列及在真核細胞中表現之一或多個真核轉錄單元兩者。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及pHyg衍生之載體為適用於轉染真核細胞之哺乳動物表現載體之實例。此等載體中之一些用來自細菌質體，諸如pBR322之序列修飾以促進在原核細胞及真核細胞中複製及抗藥性選擇。替代地，諸如牛乳頭狀瘤病毒(BPV-1)或埃-巴二氏病毒(pHEBo、pREP衍生及p205)之病毒衍生物可用於蛋白質在真核細胞中之短暫表現。其他病毒(包括反轉錄病毒)表現系統之實例可以下見於基因療法遞送系統之描述中。質體之製備及宿主生物體之轉型中使用之各種方法在此項技術中熟知。關於原核及真核細胞之其他適合表現系統以及一般重組程序，參見Sambrook、Fritsch及Maniatis編之Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第3版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在一些情況下，可能需要藉由使用桿狀病毒表現系統表現重組多肽。此等桿狀病毒表現系統之實例包括pVL衍生之載體(諸如pVL1392、pVL1393及pVL941)、pAcUW衍生之載體(諸如pAcUW1)及pBlueBac衍生之載體(諸如含有β-gal之pBlueBac III)。

在一個實施例中，載體可經設計以便在CHO細胞中產生用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB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, Wis.)。如將顯而易見，本發明基因構築體可用於引起本發明ActRIIB多肽在於培養物中繁殖之細胞中表現例如以產生蛋白質，包括融合蛋白或變異蛋白，以便純化。

用包括用於本發明ActRIIB多肽中之一或多者之編碼序列(例如SEQ ID NO:19或編碼可溶ActRIIB多肽之彼等核酸序列(例如編碼SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42及43之核酸))之重組基因轉染之宿主細胞可用於產生適用於本文所描述之方法及組合物之ActRIIB多肽。宿主細胞可為任何原核或真核細胞。舉例而言，ActRIIB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。其他適合之宿主細胞為熟習此項技術者已知。

因此，本文提供產生用於本文所描述之方法及組合物中之ActRIIB多肽之方法。舉例而言，用編碼ActRIIB多肽之表現載體轉染之宿主細胞可在合適條件下培養以允許ActRIIB多肽之表現發生。ActRIIB多肽可自含有ActRIIB多肽之細胞與培養基之混合物分泌及分離。替代地，ActRIIB多肽可以細胞質方式或在膜部分中保留且收集細胞，溶解且分離蛋白質。細胞培養物包括宿主細胞、培養基及其他副產物。用於細胞培養之適合培養基在此項技術中熟知。本發明ActRIIB多肽可使用此項技術中已知之用於純化蛋白質之技術自細胞培養基、宿主細胞或兩者分離，該等技術包括離子交換層析、凝膠過濾層析、超過濾、電泳、用對ActRIIB多肽之特定抗原決定基具有特異性之抗體免疫親和純化及用結合至與ActRIIB多肽融合之結構域之試劑親和純化(例如蛋白A管柱可用於純化ActRIIB-Fc融合物)。在一較佳實施例中，ActRIIB多肽為含有促進其純化之結構域的融合蛋白。在一較佳實施例中，純化藉由一系列管柱層析步驟實現，該等步驟以任何順序包括例如以下中之三者或三者以上：蛋白質A層析、Q瓊脂糖層析、苯基瓊脂糖層析、尺寸排外層析及陽離子交換層析。純化可用病毒過濾及緩衝液更換完成。如本文中所展現，將ActRIIB-hFc蛋白質純化至如藉由尺寸排外層析所測定之>98%及如藉由SDS

PAGE所測定之>95%之純度。此純度水準足以實現對小鼠中之骨骼之所需影響及在小鼠、大鼠及非人類靈長類動物中之可接受安全概況。

在另一實施例中，針對純化前導序列，諸如在重組ActRIIB多肽之所需部分之N端處的聚-(His)/腸激酶裂解位點序列編碼之融合基因可允許藉由使用Ni^{2+}金屬樹脂之親和性層析純化表現之融合蛋白。純化前導序列可隨後藉由用腸激酶處理來隨後移除以提供純化ActRIIB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吾人所熟知。基本上，針對不同多肽序列編碼之各種DNA片段之接合根據習知技術進行，其使用用於連接之鈍端或交錯端末端、提供合適末端之限制酶消化、按需要黏端之填充、避免非所需接合之鹼性磷酸酶處理及酶促連接。在另一實施例中，融合基因可藉由包括自動DNA合成器之習知技術合成。替代地，基因片段之PCR擴增可使用錨定引子進行，該等錨定引子在可隨後黏接以產生嵌合基因序列之兩個連續基因片段之間產生互補突出物(參見例如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等人編, John Wiley & Sons: 1992)。

ActRIIB-Fc融合蛋白可在來自pAID4載體(SV40 ori/強化子，CMV啟動子)之穩定轉染之CHO-DUKX B1 1細胞中使用SEQ ID NO:8之組織纖維蛋白溶酶原前導序列表現。Fc部分可包含如SEQ ID NO:7中所示之人類IgG1 Fc序列。在某些實施例中，在表現後，含有之蛋白質平均具有每分子ActRIIB-Fc融合蛋白，在約1.5與2.5莫耳之間的唾液酸。

在某些實施例中，ActRIIB-Fc融合物之長血清半衰期可為在人類個體中25-32天。另外，CHO細胞表現物質可具有比針對在人類293細胞中表現之ActRIIB-hFc融合蛋白報導之親和力高的對活化素B配位體

之親和力(del Re等人, J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35)。另外，不受理論束縛，使用TPA前導序列提供比其他前導序列大之產量，且不同於用天然前導序列表現之ActRIIB-Fc，可提供高度純之N端序列。使用天然前導序列可產生ActRIIB-Fc之各具有不同N端序列之兩個主要物種。

1.5.3其他ACTRII受體信號傳導抑制劑

在某些實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑為核酸化合物。

抑制ActRII受體之核酸化合物之類別之實例包括反義核酸、siRNA或RNAi構築體及催化核酸構築體。核酸化合物可為單股或雙股。雙股化合物亦可包括突出物或非互補之區域，其中股中之一者或另一者為單股。單股化合物可包括自互補之區域，意謂化合物可形成具有雙螺旋結構區域之所謂「髮夾」或「莖-環」結構。

在某些實施例中，抑制ActRII受體之核酸化合物可包含與由全長ActRII受體核酸序列或活化素核酸序列(例如活化素A或活化素B子單元(亦稱為β_A或β_B)之核酸序列)之不超過1000、不超過500、不超過250、不超過100或不超過50、35、30、25、22、20或18個核苷酸組成之區域互補的核苷酸序列。在特定實施例中，互補區將為至少8個核苷酸，且視情況至少10個或至少15個核苷酸，且視情況15與25個核苷酸之間。互補區可屬於標靶轉錄物之內含子、編碼序列或非編碼序列，諸如編碼序列部分。一般而言，抑制ActRII受體之核酸化合物之長度將為約8至約500個核苷酸或鹼基對，且視情況長度將為約14至約50個核苷酸。抑制ActRII受體之核酸化合物可為DNA (尤其用作反義)、RNA或RNA:DNA雜交種。任一股可包括DNA與RNA之混合物以及不能容易地分類為DNA或RNA之修飾形式。同樣地，雙股核酸化合物可為DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA，且任一股亦可包括DNA

與RNA之混合物，以及不能容易地分類為DNA或RNA之修飾形式。

抑制ActRII受體之核酸化合物可包括多種修飾中之任一者，包括對主鏈(天然核酸中之糖-磷酸酯部分，包括核苷酸間鍵)或鹼基部分(天然核酸之嘌呤或嘧啶部分)之一或多種修飾。在某些實施例中，反義核酸化合物之長度將為約15至約30個核苷酸且將通常含有一或多種修飾以改良某些特徵，諸如在血清中之穩定性、在細胞中之穩定性或在其中可能遞送化合物之位置(諸如在經口遞送化合物之情況下為胃及對於吸入化合物為肺)中之穩定性。在RNAi構築體之情況下，與標靶轉錄物互補之股將一般為RNA或其修飾。另一股可為RNA、DNA或任何其他變體。雙股或單股「髮夾」RNAi構築體之雙螺旋部分之長度可在某些實施例中為18至40個核苷酸且視情況長度為約21至23個核苷酸，只要其充當Dicer基質。催化或酶促核酸可為核糖核酸酶或DNA酶且亦可含有修飾形式。在某些實施例中，抑制ActRII受體之核酸化合物在生理條件下及在其中無義或有義控制具有極少效果或無效果之濃度下可將其標靶之表現抑制約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或99%以上。測試核酸化合物之效果之濃度包括1、5、10微莫耳或10微莫耳以上。

在其他實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑為抗體。此等抗體包括結合至活化素(尤其活化素A或B子單元，亦稱為βA或βB)且破壞ActRII受體結合之抗體；及結合至ActRII受體多肽(例如可溶ActRIIA或可溶ActRIIB多肽)且破壞活化素結合之抗體。

藉由使用衍生自ActRII受體多肽或活化素多肽之免疫原，抗蛋白質/抗肽免疫血清或單株抗體可藉由標準方案製造(參見例如Harlow及Lane編之Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: 1988))。諸如小鼠、倉鼠或兔之哺乳動物可用免疫原性形式之ActRII

受體多肽、能夠引發抗體反應之抗原片段或融合蛋白免疫。賦予蛋白質或肽免疫原性之技術包括與載體結合或此項技術中熟知之其他技術。ActRII受體或活化素多肽之免疫原性部分可在佐劑存在下投與。免疫接種之進程可藉由偵測血漿或血清中之抗體效價監測。標準ELISA或其他免疫分析可與作為抗原之免疫原一起使用以評估抗體水準。

在用ActRII受體多肽之抗原製劑將動物免疫接種之後，可獲得免疫血清且若需要可自血清分離多株抗體。為了產生單株抗體，可自免疫動物收集產生抗體之細胞(淋巴細胞)且藉由標準體細胞融合程序用諸如骨髓瘤細胞之永生化細胞融合以產生融合瘤細胞。此等技術在此項技術中熟知，且包括例如融合瘤技術(最初由Kohler及Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497發展)、人類B細胞融合瘤技術(Kozbar等人, (1983) Immunology Today, 4: 72)及產生人類單株抗體之EBV融合瘤技術(科爾等人, (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. 第77-96頁)。融合瘤細胞可以免疫化學方式篩選以便產生對ActRII受體多肽具有特異性反應之抗體及自包含此等融合瘤細胞之培養物分離之單株抗體。

如本文所用之術語「抗體」意欲包括亦對本發明多肽具有特異性反應性之其片段。可使用習知技術將抗體分成片段，且以與上文針對整個抗體所描述相同之方式對片段進行效用篩選。舉例而言，F(ab)2片段可藉由用胃蛋白酶處理抗體而產生。可對所得F(ab)2片段進行處理以還原二硫橋鍵，產生Fab片段。抗體進一步意欲包括具有由抗體之至少一個CDR區賦予之對ActRII受體或活化素多肽之親和力的雙特異性、單鏈、嵌合、人類化及完全人類分子。抗體可進一步包含連接至其且能夠經偵測之標籤(例如標籤可為放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子)。

在某些實施例中，抗體為重組抗體，該術語包涵部分藉由分子生物學技術產生之任何抗體，包括CDR移植或嵌合抗體、由庫選擇之抗體結構域組裝的人類或其他抗體、單鏈抗體及單結構域抗體(例如人類V_H蛋白或駱駝V_{HH}蛋白)。在某些實施例中，抗體可為單株抗體。舉例而言，產生特異性結合至ActRII受體多肽或活化素多肽之單株抗體之方法可包含向小鼠投與有效刺激可偵測免疫反應之量的包含抗原多肽之免疫原性組合物，自小鼠獲得產生抗體之細胞(例如來自脾之細胞)且將產生抗體之細胞與骨髓瘤細胞融合以獲得產生抗體之融合瘤，且測試產生抗體之融合瘤以鑑定產生特異性結合至抗原之單株抗體的融合瘤。在獲得後，融合瘤可在細胞培養物中視情況在其中融合瘤衍生細胞產生特異性結合至抗原之單株抗體的培養條件中繁殖。可自細胞培養物純化單株抗體。

如關於抗體使用之形容詞「對……具有特異性反應性」欲意謂如在此項技術中一般所理解，抗體在相關抗原(例如ActRII受體多肽)及其他不相關抗原之間充分具有選擇性，抗體至少適用於偵測特定類型之生物樣品中相關抗原之存在。在使用抗體之某些方法(諸如治療應用)中，可需要在結合方面之較高程度之特異性。單株抗體一般具有有效區分所需抗原與交叉反應多肽之較大傾向(與多株抗體相比)。影響抗體:抗原相互作用之特異性之一個特徵為抗體對抗原之親和力。儘管所需特異性可以一系列不同親和力達成，一般而言較佳抗體之親和力(解離常數)將為約10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9} 或10^{-9}以下。給定活化素與ActRII受體之間的非常緊密結合，吾人預期中和抗活化素或抗ActRII受體抗體之解離常數將一般為10^{-10}或10^{-10}以下。

此外，用於篩選抗體以便鑑定所需抗體之技術可影響所獲得之抗體之特性。舉例而言，若抗體用於在溶液中結合抗原，則可能需要測試溶液結合。多種不同技術可用於測試抗體與抗原之間的相互作用

以鑑定尤其所需之抗體。此等技術包括ELISA、表面電漿子共振結合分析(例如Biacore.TM.結合分析, Biacore AB, Uppsala, Sweden)、夾心分析(例如IGEN International, Inc., Gaithersburg, Md.之順磁珠粒系統)、西方墨點、免疫沈澱分析及免疫組織化學。

在某些實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑包括活化素之替代形式，尤其具有I型受體結合結構域中之變化之彼等可結合至II型受體且未能形成活性三元複合物。在某些實施例中，抑制活化素A、B、C或E或尤其ActRII受體表現之核酸(諸如反義分子、siRNA或核糖核酸酶)可用於本文所描述之組合物及方法中。在某些實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑相對於TGF-β家族之其他成員，尤其相對於GDF8及活化素，展示對抑制GDF11介導之信號傳導之選擇性。

在其他實施例中，用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑為具有ActRII受體拮抗劑活性之非抗體蛋白，包括抑制素(亦即抑制素α子單元)、卵泡抑素(例如卵泡抑素-288及卵泡抑素-315)、賽貝魯斯(Cerberus)、卵泡抑素相關蛋白(「FSRP」)、內皮因子、活化素C、α(2)-巨球蛋白及M108A (在位置108處甲硫胺酸至丙胺酸變化)突變活化素A。

在一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑為拮抗活化素生物活性及/或結合至活化素之卵泡抑素多肽。術語「卵泡抑素多肽」包括包含卵泡抑素之任何天然存在之多肽以及保留適用活性之其任何變異體(包括突變體、片段、融合物及肽模擬物形式)的多肽，且進一步包括卵泡抑素之任何功能單體或多聚體。保留活化素結合特性之卵泡抑素多肽之變異體可基於涉及卵泡抑素及活化素相互作用之先前研究鑑定。舉例而言，以全文引用之方式包括在本文中之WO2008/030367揭示顯示對於活化素結合重

要之特異性卵泡抑素結構域(「FSD」)。卵泡抑素多肽包括衍生自具有與卵泡抑素多肽序列至少約80%一致，且視情況至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上一致性之序列的任何已知卵泡抑素序列的多肽。卵泡抑素多肽之實例包括如例如以全文引用之方式包括在本文中之WO2005/025601中所描述之成熟卵泡抑素多肽或人類卵泡抑素前驅體多肽之較短同功異型物或其他變異體。

在一特定實施例中，欲用於本文所描述之組合物及方法中之ActRII信號傳導抑制劑為拮抗活化素生物活性及/或結合至活化素之卵泡抑素樣相關基因(FLRG)。術語「FLRG多肽」包括包含FLRG之任何天然存在之多肽以及保留適用活性之其任何變異體(包括突變體、片段、融合物及肽模擬物形式)的多肽。保留活化素結合特性之FLRG多肽之變異體可使用分析及活化素相互作用之常規方法鑑定。參見例如美國專利第6,537,966號，其以全文引用之方式包括在本文中。FLRG多肽包括衍生自具有與FLRG多肽序列至少約80%一致，且視情況至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上一致性之序列的任何已知FLRG序列之多肽。

在某些實施例中，卵泡抑素多肽及FLRG多肽之功能變異體或修飾形式包括具有至少一部分卵泡抑素多肽或FLRG多肽及一或多個融合結構域，諸如促進多肽之分離、偵測、穩定化或多聚合之結構域的融合蛋白。適合之融合結構域以上參考ActRIIA及ActRIIB多肽詳細地論述。在一個實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為包含融合至Fc結構域之卵泡抑素多肽之活化素結合部分的融合蛋白。在另一實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為包含融合至Fc結構域之FLRG多肽之活化素結合部分的融合蛋白。

1.6分析

可測試各種ActRII多肽變異體或可溶ActRII多肽變異體之抑制

ActRII之能力。此外，可測試化合物抑制ActRII之能力。在確認ActRII信號傳導活性之抑制劑後，此等化合物可與本文所提供之方法一起使用。ActRII可為ActRIIA或ActRIIB。以下分析針對ActRIIA所描述但可類似地針對ActRIIB進行。

1.6.1 評估SNAI1、磷酸化SMAD2、磷酸化SMAD3、尿蛋白、DKK1、COL1A1、活化素(例如游離活化素)、RUNX2、ALP、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ACTRIIA、AXIN2及/或SM22-α水準及/或活性

Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性可藉由此項技術中已知或本文所描述之任何方法測定。舉例而言，組織樣品中Snai1、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準可藉由使用例如北方墨點法、PCR分析、即時PCR分析或此項技術中已知或本文所描述之任何其他技術在樣品中分別評估(例如定量) Snai1、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、奧斯特里克斯、Alp、BSAP、CTX、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之經轉錄RNA來測定。熟習此項技術者將認識到，Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之水準及/或活性可獨立地且分別與對應參考群體之水準及/或活性比較，諸如以上在章節1.3.1中所描述。在一個實施例中，組織樣品中Snai1、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、

MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準可藉由在樣品中分別評估(例如定量)Snail、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之mRNA來測定。在一特定實施例中，Snail、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之mRNA水準藉由定量反轉錄酶聚合酶鏈反應(qRT-PCR)測定。在一特定實施例中，Runx2 mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:58之核酸序列。在一特定實施例中，Alp mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:59之核酸序列。在一特定實施例中，Snail mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:74之核酸序列。在一特定實施例中，Dkk1 mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:75之核酸序列。在一特定實施例中，col1a1 mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:76之核酸序列。在一特定實施例中，活化素mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:77之核酸序列。在一特定實施例中，奧斯特里克斯mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:60之核酸序列。在一特定實施例中，克羅索mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:61之核酸序列。在一特定實施例中，α-SMA mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:70之核酸序列。在一特定實施例中，MYOCD mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:71之核酸序列。在一特定實施例中，Sm22-α mRNA之核酸序列包含SEQ ID NO:62之核酸序列。在一特定實施例中，qRT-PCR用Runx2特異性引子(SEQ ID NO:48及49)進行以測定Runx2水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用Alp特異性引子(SEQ ID NO:50及51)進行以測定Alp水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用Snail特異性引子(SEQ ID NO:78及79)進行以測定Snail水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用Dkk1特異性引子(SEQ ID NO:80及81)進行以測定Dkk1水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用col1a1特異性

引子(SEQ ID NO:82及83)進行以測定col1a1水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用活化素特異性引子(SEQ ID NO:84及85)進行以測定活化素水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用奧斯特里克斯特異性引子(SEQ ID NO:52及53)進行以測定奧斯特里克斯水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用克羅索特異性引子(SEQ ID NO:54及55)進行以測定克羅索水準。在一特定實施例中，qRT-PCR用Sm22-α特異性引子(SEQ ID NO:56及57)進行以測定Sm22-α水準。

組織樣品中Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準亦可藉由使用例如免疫組織化學分析、西方墨點法、ELISA、免疫沈澱、流動式細胞測量術分析或此項技術中已知或本文所描述之任何其他技術在樣品中分別評估(例如定量)Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之蛋白質表現水準來測定。在一特定實施例中，Runx2蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:63之胺基酸序列。在一特定實施例中，Alp蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:64之胺基酸序列。在一特定實施例中，Snai1蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列。在一特定實施例中，Dkk1蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列。在一特定實施例中，col1a1蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:88之胺基酸序列。在一特定實施例中，活化素(例如游離活化素)蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:89之胺基酸序列。在一特定實施例中，BSAP蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:72之胺基酸序列。在一特定實施例中，奧斯特里克斯蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:65

之胺基酸序列。在一特定實施例中，克羅索蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:66之胺基酸序列。在一特定實施例中，α-SMA蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:68之胺基酸序列。在一特定實施例中，MYOCD之胺基酸序列包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列。在一特定實施例中，Sm22-α蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:67之胺基酸序列。在一特定實施例中，ActRIIA蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列。在一特定實施例中，ActRIIA蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列。在一特定實施例中，ActRIIA蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列。在一特定實施例中，ActRIIA蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列。在一特定實施例中，ActRIIA蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列。在一特定實施例中，Axin2蛋白質之胺基酸序列包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列。在特定實施例中，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性藉由西方墨點法測定。在一特定實施例中，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之活性藉由對經Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2或Sm22-α調節之蛋白質進行西方墨點分析測定。在特定實施例中，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、

ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準藉由能夠分別定量存在於個體之組織樣品中(例如人類血清中)之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之量，及/或能夠在用ActRII信號傳導抑制劑處理之後分別偵測Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之校正的方法測定。在一個實施例中，組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準藉由使用ELISA在樣品中分別評估(例如定量)Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之蛋白質表現來測定。舉例而言，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α可在人類血清中使用ELISA方法鑑定及定量。用於測定組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之ELISA方法可包含用組織樣品(例如人類血清)塗佈ELISA板，且在分別結合至Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活

化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α特異性抗體之組織樣品(例如人類血清)中分別偵測Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α。在一些實施例中，如本文所描述之用於測定Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性之方法(例如ELISA)能夠偵測100 pg/ml之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α。在一特定實施例中，ELISA用Runx2特異性抗體SC-390715 (Santa Cruz)進行以測定Runx2水準。在一特定實施例中，ELISA用Alp特異性抗體SC-98652 (Santa Cruz)進行以測定Alp水準。在一特定實施例中，ELISA用Snai1特異性抗體sc-393172 (Santa Cruz)進行以測定Snai1水準。在一特定實施例中，ELISA用磷酸化smad2特異性抗體sc-101801 (Santa Cruz)進行以測定磷酸化smad2水準。在一特定實施例中，ELISA用磷酸化smad3特異性抗體sc-130218 (Santa Cruz)進行以測定磷酸化smad3水準。在一特定實施例中，ELISA用Dkk1特異性抗體sc-374574 (Santa Cruz)進行以測定Dkk1水準。在一特定實施例中，ELISA用col1a1特異性抗體sc-8784 (Santa Cruz)進行以測定col1a1水準。在一特定實施例中，ELISA用活化素特異性抗體A1594 (Sigma Aldrich)進行以測定活化素(例如游離活化素)水準。在一特定實施例中，ELISA用BSAP特異性抗體SC-98652 (Santa Cruz)進行以測定BSAP水準。在一特定實施例中，

ELISA用CTX特異性抗體ABIN1173415 (Antibodies Online)進行以測定CTX水準。在一特定實施例中，ELISA用奧斯特里克斯特異性抗體SC-22538 (Santa Cruz)進行以測定奧斯特里克斯水準。在一特定實施例中，ELISA用克羅索特異性抗體SC-22218 (Santa Cruz)進行以測定克羅索水準。在一特定實施例中，ELISA用α-SMA特異性抗體SC-53142 (Santa Cruz)進行以測定α-SMA水準。在一特定實施例中，ELISA用MYOCD特異性抗體SC-21561 (Santa Cruz)進行以測定MYOCD水準。在一特定實施例中，ELISA用Sm22-α特異性抗體SC-271719 (Santa Cruz)進行以測定Sm22-α水準。在一特定實施例中，ELISA用ActRIIA特異性抗體ab 135634 (Abcam)進行以測定ActRIIA水準。

本文所描述之Elisa分析中所描述之Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之水準可獨立地及分別與對應參考群體之水準及/或活性比較，諸如上文在章節1.3.1中所描述。

在量測樣品中(例如組織樣品，例如主動脈、血液、血清、血漿、肝臟、脾及/或骨髓樣品中) Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準之分析中使用的抗體在此項技術中已知或可容易地使用熟習此項技術者已知之方法產生。可在量測樣品中Runx2之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-B4293、LS-B4294、LS-B4296；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號sc-390715；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品

號：WH0000860M1。可在量測樣品中Alp之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-B2877、LS-B1844、LS-C169212；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-98652；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB1405449。可在量測樣品中Snail之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-C161335、LS-C198229及LS-C169298；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-393172；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB1404386。可在量測樣品中磷酸化smad2之水準之分析中使用之抗體之實例包括來自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-101801；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB4200251及SAB4300252。可在量測樣品中磷酸化smad3之水準之分析中使用的抗體之實例包括來自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-130218；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB4300253及SAB4504210。可在量測樣品中Dkk1之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-C108793、LS-C105116及LS-C105117；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-374574；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：WH0022943M1。可在量測樣品中colla1之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-B5932；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-8784；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：C2456。可在量測樣品中活化素(例如游離活化素)

之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-C308491；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：A1719。可在量測樣品中BSAP之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-B2877、LS-B1844、LS-C169212；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-98652；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB1405449。可在量測樣品中CTX之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括ABIN1173415 (Antibodies Online)。可在量測樣品中奧斯特里克斯之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-C139215、LS-C132610、LS-B6531；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-133871；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：WH0121340M1。可在量測樣品中克羅索之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-C165587、LS-C145689、LS-C8376；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-22218；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB1306662。可在量測樣品中α-SMA之水準之分析中使用的抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-B6000、LS-B5966、LS-B2161；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：SC-21561；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：A5228。可在量測樣品中MYOCD之水準之分析中使用的抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-C37407、LS-C153495、LS-c137255；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄

號：SC-53142；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：M8948。可在量測樣品中Sm22-α之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA之抗體，目錄號LS-B2563、LS-C139114、LS-C210979；可購自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA之抗體，目錄號：sc-271719；及可購自Sigma-Aldrich Co. LLC之抗體，產品號：SAB2501014。可在量測樣品中ActRIIA之水準之分析中使用的單株抗體之實例包括來自Abcam之抗體，產品碼：ab135634。

Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之活性可藉由此項技術中已知之任何分析量測，分析包括(但不限於)報導基因分析(例如分別含有Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2或Sm22-α反應性報導基因構築體)或任何其他生物活性分析。

Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性可在自根據本文所描述之方法治療之個體獲得之任何組織樣品中評估。在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性在自根據本文所描述之方法治療之個體之主動脈、血清、肝臟、脾或骨髓獲得的樣品中評估。在一個實施例中，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、

Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性在自根據本文所描述之方法治療之個體之血清獲得的樣品中評估。在另一實施例中，Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性在自根據本文所描述之方法治療之個體之主動脈、脾獲得的樣品中評估。在另一實施例中，Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性在自根據本文所描述之方法治療之個體之骨髓獲得的樣品中評估。

熟習此項技術者將認識到使用此項技術中已知及本文所描述之分析測定之Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之活性可分別與對應參考群體之水準及/或活性比較，諸如上文在章節1.3.1中所描述。

在一些實施例中，將個體之組織樣品中Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與如章節1.6中所描述之參考群體之組織樣品中(例如來自相同組織之樣品中)Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、

克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性比較。在一些實施例中，將個體之組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與在較早時間點(例如在疾病發作之前、在治療開始之前或在治療期間)個體之組織樣品中(例如來自相同組織之樣品中) Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性比較。在一些實施例中，將個體之組織樣品(例如主動脈、血清、脾、肝臟或血液骨髓)中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與個體之另一組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索及/或Sm22-α之水準及/或活性比較。在一些實施例中，將個體之組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性與個體之組織樣品中另一基因產物(例如b-肌動蛋白、活化素A、活化素B)之水準及/或活性比較。

在一些實施例中，將個體之組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、

MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與參考群體之組織樣品中Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性比較。在一些實施例中，分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性相比，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性升高之偵測接著為投與活化素受體信號傳導抑制劑(諸如一或多種本文所描述之活化素受體信號傳導抑制劑)。在一些實施例中，投與活化素受體信號傳導抑制劑(諸如一或多種本文所描述之活化素受體信號傳導抑制劑)接著為監測Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性，及視情況將Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性比較。在一些實施例中，投與第一劑量之ActRII信號傳導抑制劑(例如，諸如SEQ ID NO:7

之ActRIIA-hFc)接著為測定Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性，且若Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯之水準及/或活性分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯之水準及/或活性相比升高，及/或若克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性相比降低，則投與比第一劑量高(例如高1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9或10倍)之第二劑量之ActRII信號傳導抑制劑，且若Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯之水準及/或活性分別與參考群體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯之水準及/或活性相比降低，及/或若克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性相比升高，則投與比第一劑量低(例如低1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9或10倍)之第二劑量之ActRII信號傳導抑制劑。在某些實施例中，參考群體為如章節1.6中所描述之群體。

在一些實施例中，將經治療個體之組織樣品中Snail、磷酸化

smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性分別與來自一或多名健康個體之相同組織的樣品中Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性比較。在一些實施例中，評估Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性的組織為主動脈、血清、骨髓、肝臟或脾。在一個實施例中，評估Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性的組織為血清。

在某些實施例中，升高之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性分別比參考群體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別比參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在某些實施例中，升高之Snai1、磷酸化

smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性分別等於參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性或比該水準及/或活性高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別等於參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性，或比該水準及/或活性低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在某些實施例中，參考群體如章節1.6中所描述。

在某些實施例中，升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性分別比參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或降低之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性分別比參考群體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在某些實施例中，升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性等於參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前

1%之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準及/或活性或比該水準及/或活性高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或降低之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性等於參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準及/或活性或比該水準及/或活性低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在某些實施例中，參考群體如章節1.6中所描述。

在某些實施例中，活化素之水準為游離活化素(諸如不與例如卵泡抑素、卵泡抑素樣3或抑制素相關之活化素)之水準。游離活化素之水準可藉由例如以下測定：(i)將樣品中，例如血漿中活化素之濃度定量；(ii)將樣品中與活化素相關之蛋白質，諸如卵泡抑素、卵泡抑素樣3及抑制素之濃度定量；及(iii)計算活化素濃度與活化素相關蛋白質之濃度之化學計量比。

本文所描述之分析亦可用於測定其他蛋白質及/或轉錄物(諸如FGF23、卵泡抑素、卵泡抑素樣3、抑制素、參與內皮細胞至間葉細胞轉化之蛋白質及/或轉錄物)之水準及/或活性。

在某些實施例中，Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之水準及/或活性在組織(例如組織樣品)中。在某些實施例中，組織為主動脈。在某些實施例中，組織為腎臟。在某些實施例中，組織為骨骼。在某些實施例中，組織為血清。

在一較佳實施例中，Runx2、Dkk1、Alp、奧斯特里克斯、Sm22-α、克羅索、α-SMA、ActRIIA、Axin2及MYOCD水準及/或活性在主動脈中。在一較佳實施例中，磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、ActRIIA、Axin2及col1a1水準及/或活性在腎臟中。在一較佳實施例中，活化素水準及/或活性在血清中。在某些實施例中，升高之活化素水準在小管周圍肌纖維母細胞中。在某些實施例中，升高之活化素水準不在腎上皮中。在某些實施例中，升高之活化素水準在小管周圍肌纖維母細胞中，且升高之活化素水準不在腎上皮中。

熟習此項技術者將認識到Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-α、磷酸化smad3及尿蛋白中之一或多者之水準及/或活性可獨立地及分別與對應參考群體之水準及/或活性比較，諸如上文在章節1.3.1中所描述。

1.6.2參考群體

在某些實施例中，自本文所描述之參考群體獲得之資料(例如生物標記水準或臨床症狀)用於確定自根據本文所提供之方法治療或待治療之個體獲得之類似資料是否病理性高(例如增加)或低(例如降低)。

在某些實施例中，參考群體之大小可為1、5、10、25、50、75、100、200、250、300、400、500或1000名個體。在某些實施例中，參考群體由隨機志願者組成。在某些實施例中，參考群體由健康人類組成。在某些實施例中，參考群體由年齡、體重及/或性別與如章節1.4中所描述之患者群體相同之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無心血管疾病之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無血管鈣化之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無心血管疾病之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無與血管鈣化相關及/或由

血管鈣化引起之心血管疾病的人類組成。在某些實施例中，參考群體由無腎病之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無慢性腎病之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無病理地升高之動脈硬度水準之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病的人類組成。在某些實施例中，參考群體由無LVH之人類組成。在某些實施例中，參考群體由無與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病的人類組成。

在某些實施例中，參考群體係指在心血管疾病之一或多種症狀發作之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在血管鈣化之一或多種症狀發作之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在慢性腎病之一或多種症狀發作之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在動脈硬度水準升高之一或多種症狀發作之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在LVH之一或多種症狀發作之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷個體之心血管疾病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷個體之血管鈣化之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷個體之慢性腎病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷1期慢性腎病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷2期慢性腎病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷3期慢性腎病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷4期慢性腎病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷5期慢性腎病之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某

些實施例中，參考群體係指在診斷個體之動脈硬度水準升高之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體係指在診斷個體之LVH之前根據本文所提供之方法治療之個體。在某些實施例中，參考群體由在根據本文所提供之方法治療或診斷有本文所描述之疾病之前展示動脈硬度增加之人類組成。在某些實施例中，參考群體由在根據本文所提供之方法治療或診斷有本文所描述之疾病之前展示發明內容中敍述之標記中之一者之上升趨勢的人類組成。在某些實施例中，參考群體由在根據本文所提供之方法治療或診斷有本文所描述之疾病之前展示Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、colla1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、磷酸化smad3及/或尿蛋白水準增加之人類組成。在某些實施例中，參考群體由在根據本文所提供之方法治療或診斷有本文所描述之疾病之前展示發明內容中敍述之標記中之一者之下降趨勢的人類組成。在某些實施例中，參考群體由在根據本文所提供之方法治療或診斷有本文所描述之疾病之前展示α-SMA、MYOCD、Sm22-α或ActRIIA水準降低之人類組成。

1.6.3內皮細胞-間葉細胞轉化

在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體之EnMT可經由譜系追蹤分析監測以測定細胞群體之命運。在某些實施例中，根據本文所提供之方法治療之個體之EnMT可藉由將一或多種與EnMT相關之蛋白質或轉錄物(諸如Snail)之水準及/或活性定量來監測。

1.6.4骨骼轉換

骨骼轉換之各種循環標記可用於診斷骨骼病症，諸如低骨骼轉換。骨骼轉換之循環標記為骨骼形成之標記，諸如骨特異性鹼性磷酸酶(bAP)、骨鈣化素、原膠原I型C端前肽(PICP)及胰島素樣生長因子-1(IGF-1)；一些為骨骼再吸收之標記，諸如吡啶啉、脫氧吡啶啉、耐酒石酸鹽之酸性磷酸酶(TRAP)、TRAP 5b型、吡啶啉、脫氧吡啶啉及

原膠原I型C端肽(ICTP)、血清或尿液膠原蛋白交聯(N端肽或C端肽)及25羥基維生素D。亦可使用量測整個副甲狀腺激素(PTH)分子之分析。熟習此項技術者瞭解允許評估骨礦物質密度(BMD)、骨體積、小樑骨體積及小樑厚度之成像方法。參見例如Tilman B. Drueke及Sharon M. Moe, Disturbances of bone and mineral metabolism in chronic kidney disease: an international initiative to improve diagnosis and treatment, Nephrol Dial Transplant (2004) 19: 534-536；Okuno S, Inaba M., Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Dialysis and bone metabolic marker, Clin Calcium. 2009 Aug;19(8):1084-91；Herberth J, Monier-Faugere MC, Mawad HW, Branscum AJ, Herberth Z, Wang G, Cantor T, Malluche HH, The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 subjects, Clin Nephrol. 2009 Jul;72(1):5-14；Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G., Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in subjects with chronic kidney disease Stages 3 - 5, Clin Nephrol. 2008 Oct;70(4):296-305；Drüeke TB., Is parathyroid hormone measurement useful for the diagnosis of renal bone disease?, Kidney Int. 2008 Mar;73(6):674-6；Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E, Nishizawa Y., Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in subjects with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction., Clin Endocrinol (Oxf). 2008 Aug;69(2):189-96. Epub 2008 Jan 23。亦參見Paul D. Miller, Diagnosis and Treatment of Osteoporosis in Chronic Renal Disease, 2009。

監測具有輕度腎功能障礙之CKD個體中之骨骼再吸收的另一標

記為I型膠原蛋白N端肽之血清濃度(S-NTX)。參見例如Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Okada N, Imai E, Horio M, Ito T., Serum NTX is a practical marker for assessing antiresorptive therapy for glucocorticoid treated subjects with chronic kidney disease., Bone. 2006 Nov;39(5):1067-72. Epub 2006 Jun 16。

亦可使用定量電腦斷層攝影術(QCT)測定骨骼轉換。

可評估諸如Runx2及Alp之標記以監測個體之骨母細胞轉化。可評估諸如Sm22-α之標記以監測血管平滑肌功能及分化血管平滑肌細胞之水準。

1.6.5鈣水準

鈣水準可藉由熟習此項技術者已知之方法，諸如鈣離子選擇電極分析。在某些實施例中，總鈣水準在血清、血液、主動脈或尿液中量測。

1.6.6血管鈣化

用於使冠狀動脈鈣化(CAC)之程度成像之非對比電腦斷層攝影術(CT)及用於非侵襲性冠狀動脈血管攝影術(CTA)之對比CT為一般用於診斷阻塞性冠狀動脈疾病之發展。亦可使用用於診斷及預後性心臟評估之放射性核種應力測試、冠狀動脈鈣掃描及非侵襲性冠狀動脈血管攝影術。參見：Berman DS, Shaw LJ, Hachamovitch R, Friedman JD, Polk DM, Hayes SW, Thomson LE, Germano G, Wong ND, Kang X, Rozanski A., Comparative use of radionuclide stress testing, coronary artery calcium scanning, and noninvasive coronary angiography for diagnostic and prognostic cardiac assessment, Semin Nucl Med. 2007 Jan;37(1):2-16。

來自無症狀個體之冠狀動脈鈣篩選結果可用作比較。舉例而言，當血管鈣化與腎病有關時，在腎病發作之前獲得之鈣篩選結果可

用作比較。

偵測及定量冠狀動脈鈣化(CAC)之可能方法包括(但不限於) x射線電腦斷層攝影術及心肌灌注單光子發射電腦斷層攝影術(SPECT)。Moser KW, O'Keefe JH Jr, Bateman TM, McGhie IA., Coronary calcium screening in asymptomatic subjects as a guide to risk factor modification and stress myocardial perfusion imaging, J Nucl Cardiol. 2003 Nov-Dec;10(6):590-8。亦可使用多偵測器電腦斷層攝影術(MDCT)偵測血管鈣化(參見例如Burrill等人, 2007, Postgrad. Med. J. 83(985):698-704)。

用於血管鈣化之另一診斷方法為在組合正電子發射斷層攝影法(PET)/電腦斷層攝影術(CT)下在胸主動脈壁中之氟18氟脫氧葡萄糖(FDG)吸收。參見：Tatsumi M, Cohade C, Nakamoto Y, Wahl RL., Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis, Radiology. 2003 Dec;229(3):831-7. Epub 2003 Oct 30。

在甚至另一實施例中，可使用超高速CT偵測動脈粥樣硬化冠狀動脈疾病之存在。參見例如Breen JF, Sheedy PF 2nd, Schwartz RS, Stanson AW, Kaufmann RB, Moll PP, Rumberger JA, Coronary artery calcification detected with ultrafast CT as an indication of coronary artery disease, Radiology. 1992 Nov;185(2):435-9。

亦可使用電子束電腦斷層攝影術掃描診斷冠狀動脈疾病。參見：Schmermund A, Baumgart D, Sack S, Möhlenkamp S, Grönemeyer D, Seibel R, Erbel R., Assessment of coronary calcification by electron-beam computed tomography in symptomatic subjects with normal, abnormal or equivocal exercise stress test, Eur Heart J. 2000 Oct;21(20):1674-82。

用於血管鈣化之另一測試關於致叢性及血栓栓塞肺高血壓中之斑塊組成。慢性血栓栓塞肺高血壓與具有富含血型糖蛋白之髓樣核的動脈粥樣硬化斑塊相關，且致叢性肺高血壓與纖維斑塊相關。血栓栓塞物質在形成髓樣核中發揮重要作用，其中紅血球膜衍生之血型糖蛋白為主要組分。藉此，研究慢性血栓栓塞及致叢性肺高血壓(原發及繼發性(艾生曼格(Eisenmenger)症候群))。參見：Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovella F, Viganó M, Tavazzi L, Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation, Heart. 2002 Aug;88(2):177-82。

可使用蓋斯頓記分(基於沈積鈣斑之密度量測值之鈣記分系統)定量血管鈣化。在此系統中，血管鈣化水準可藉由多偵測器電腦斷層攝影術(MDCT)量測且可評估蓋斯頓記分之進展率之衰減(參見例如Sharma等人, 2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:603-611)。

此外，血管鈣化可使用Adragao等人, 2004, Nephrol. Dial. Transplant 19:1480-1488中所描述之方法評估。

用於定量個體之血管鈣化之另一分析為病變特定鈣記分，其包含由用於冠狀動脈鈣化之CT測試產生的鈣量測之方法。 此方法由例如Akram及Voros, 2008, Int. J. cardiovac. Imaging 14:743-749描述。

1.6.7心臟大小及心臟肥大

心臟大小及心臟肥大可藉由熟習此項技術者已知之任何方法，諸如磁共振成像、心電圖、心動回聲圖及非對比度增強心臟電腦斷層攝影術測定。

1.6.8動脈硬度

動脈硬度水準可藉由熟習此項技術者已知之任何方法，諸如超音波都卜勒(Doppler)測試、磁共振成像(包括磁共振動脈攝影術)、電

腦化斷層攝影術(CT) (包括CT血管攝影術)及此項技術中已知之其他形式之血管攝影術測定。

1.6.9腎病

腎小球濾過率、菊糖清除率、高磷酸鹽血症及BUN水準可藉由熟習此項技術者已知之任何方法測定以確定腎病。腎纖維化及/或腎小球硬化可藉由熟習此項技術者已知之任何方法，諸如對腎臟組織進行活組織檢查及檢查組織之疤痕來診斷及/或監測。腎纖維化及/或腎小球硬化亦可藉由例如量測腎小球濾過率及/或進行腎臟之超音波來診斷及/或監測。參見國立腎臟基金會之網站。

1.6.10動物模型

動脈粥樣硬化*低密度脂蛋白受體*缺乏型*(ldlr-/-)*雄性(C57Bl/6J背景)可購自Jackson Laboratories且在12週齡開始喂入高脂肪飲食(42%來自脂肪之熱量) (Teklad號)。小鼠肥胖，在22週齡耐胰島素，在28週齡有糖尿病及有高膽固醇血症。

可利用兩步程序產生如先前(Davies, M.R.,等人, 2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567；Davies, M.R.,等人, 2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928)所描述之慢性腎病。可在出生後12週經由2 cm側腹切口將電灼法施加至右側腎臟，接著為在14週齡進行左側腎全切除術。改變灼燒術之強度以產生藉由在20週齡之菊糖清除率確認的中度(CKD-3)腎損傷。向小鼠對照組，野生型C57Bl/6J小鼠喂入常規飲食，其為用於規範性對照值之正常腎功能及飲食組。第二組為喂入高脂肪飲食且假操作之*ldlr-/-*小鼠，其具有正常腎功能，且充當用以確定腎病影響之對照組。第三組為喂入高脂肪飲食，GFR等於人類CKD 3期降低之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3)，在22週安樂死，基線血管鈣化組(CKD-3)。第四組為接受在22週開始之一週兩次媒劑之皮下注射直至在28週安樂死之患有CKD-3之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3 V)。第五組為患有CKD-3，接受在22

週開始之mActRIIA-Fc (Celgene, Summit, NJ)，10 mg/kg一週兩次之皮下注射直至在28週安樂死之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3 mActRIIA-Fc)。使用之劑量先前於PK/PD研究中顯示為刺激骨骼形成之有效劑量(Lotinun, S.,等人, 2010. Bone 46:1082-1088)。

使用之CKD之第二模型為X相關奧爾波特氏症候群之鼠同源物，該症候群為在基因中缺乏IV型膠原蛋白之α5鏈COL4A5 (Rheault, M.N.,等人, 2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474)。此為自發性腎病之模型。育種對可購自Jackson Laboratories且經育種用於實驗。在出生之後200天時半合子雄性自發地罹患與人類CKD 3-4期類似之腎病。

CKD之第三模型為在用於細胞譜系追蹤之轉殖基因小鼠系，GNZ小鼠中之腎切除，其類似於*ldlr-/-*方案。GNZ報導子雌性小鼠(Stoller, J.Z.,等人, 2008. Genesis (New York, N.Y. 2000) 46:200-204)及Tek-Cre轉殖基因雄性小鼠(Koni, P.A.,等人, 2001. The Journal of Experimental Medicine 193:741-754)可購自Jackson Laboratories且經育種以產生GNZ/Tek-Cre+小鼠用於實驗。GNZ/Tek-Cre同胎仔畜充當陰性對照。小鼠基因分型可藉由使用由製造商針對GNZ及Tek-Cre小鼠品系建議之特異性引子進行。

1.6.11轉錄反應分析

在某些實施例中，轉錄反應分析可用於測試ActRII信號傳導抑制劑或Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之活性。在ActRII、Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、奧斯特里克斯、Alp、BSAP、CTX、克羅索、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α信號傳導後，某些基因之轉錄

上調或下調。使用細胞培養系統且可量測(例如藉由RT-PCR)轉錄反應。試劑對轉錄反應之影響為其效用或活性之量度。在某些實施例中，已知對ActRII、Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、collal、活化素(例如游離活化素)、Runx2、奧斯特里克斯、Alp、BSAP、CTX、克羅索、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α信號傳導有反應之啟動子區域可在報導基因之上游選殖。以此方式，可簡化分析以使得僅需要分析報導基因之活性。

1.6.12篩選分析

可測試各種ActRII多肽變異體或可溶ActRII多肽變異體之抑制ActRII之能力。此外，可測試化合物抑制ActRII之能力。在確認ActRII信號傳導活性之抑制劑後，此等化合物可與本文所提供之方法一起使用。ActRII可為ActRIIA或ActRIIB。以下分析針對ActRIIA所描述但可類似地針對ActRIIB進行。

舉例而言，可評估ActRIIA多肽變異體對參與骨骼產生或骨骼破壞之基因之表現的影響。此可視需要在一或多種重組ActRIIA配位體蛋白(例如活化素)存在下進行，且可轉染細胞以便產生ActRIIA多肽及/或其變異體，及視情況，ActRIIA配位體。同樣地，可向小鼠或其他動物投與ActRIIA多肽，且可評估一或多種骨骼特性，諸如密度或體積。亦可評估骨折之癒合速率。雙能量x射線吸光測定法(DEXA)為評估動物中之骨密度的公認非侵襲性定量技術。在人類中，可使用中心DEXA系統評估脊椎及骨盆中之骨密度。此等為整體骨密度之最佳預測因子。可使用外周DEXA系統評估外周骨(包括例如手、手腕、踝及腳之骨骼)中之骨密度。可使用包括CAT掃描之傳統x射線成像系統評估骨骼生長及骨折癒合。此外，可使用定量電腦斷層攝影術(qCT)量測骨密度。亦可評估骨骼之機械強度。

在某些態樣中，本文提供ActRIIA多肽(例如可溶ActRIIA多肽)及

活化素多肽用於鑑定作為活化素-ActRIIA信號傳導路徑之促效劑或拮抗劑的化合物(試劑)之用途。經由此篩選鑑定之化合物可經測試以評估其活體外調節骨骼生長或礦化之能力。視情況，此等化合物可進一步在動物模型中測試以評估其活體內調節組織生長之能力。

存在許多篩選用於藉由靶向活化素及ActRIIA多肽調節組織生長之治療劑的方法。在某些實施例中，可進行化合物之高通量篩選以鑑定干擾活化素或ActRIIA介導之對骨骼之影響的試劑。在某些實施例中，進行分析以篩選及鑑定特異性抑制或減少ActRIIA多肽與活化素之結合的化合物。替代地，分析可用於鑑定增強ActRIIA多肽與活化素之結合之化合物。在另一實施例中，化合物可藉由其與活化素或ActRIIA多肽相互作用之能力鑑定。

多種分析形式將滿足且鑒於本發明，本文未明確描述之彼等將仍然經一般熟習此項技術者理解。如本文所描述，本文所用之測試化合物(試劑)可藉由任何組合化學方法產生。替代地，本發明化合物可為活體內或活體外合成之天然存在之生物分子。待測試其充當組織生長調節劑之能力之化合物(試劑)可例如藉由細菌、酵母、植物或其他生物體(例如天然產品)產生，以化學方式產生(例如小分子，包括肽模擬物)或以重組方式產生。本文中涵蓋之測試化合物包括非肽基有機分子、肽、多肽、肽模擬物、糖、激素及核酸分子。在一特定實施例中，測試試劑為分子量小於約2,000道爾頓之較小有機分子。

測試化合物可以單一、離散實體形式提供或以具有較大複雜性之庫(諸如藉由組合化學方法產生)提供。此等庫可包含例如醇、烷基鹵化物、胺、醯胺、酯、醛、醚及其他類別之有機化合物。測試化合物至測試系統之呈遞可呈分離形式或以化合物之混合物形式，尤其在初始篩選步驟中。視情況，化合物可用其他化合物衍生且具有促進化合物分離之衍生基團。衍生基團之非限制性實例包括生物素、螢光

素、洋地黃毒苷、綠色螢光蛋白、同位素、聚組胺酸、磁性珠粒、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萃取物庫之許多藥物篩選程序中，高通量分析為所需的以便使在給定時間段內調查之化合物數目最大化。在無細胞系統(諸如可用純化或半純化蛋白質衍生)中進行之分析通常作為「初步」篩選較佳，因為其可經產生以准許快速發展及相對容易偵測分子標靶中藉由測試化合物介導之變化。此外，測試化合物之細胞毒性或生物可用性之影響可一般在活體外系統中忽略，分析替代地主要集中於藥物對分子標靶之影響，如可在ActRIIA多肽與活化素之間的結合親和力變化中顯現。

僅為了說明，在例示性篩選分析中，使相關化合物與通常能夠結合至活化素之分離及純化ActRIIA多肽接觸。隨後向化合物與ActRIIA多肽之混合物中添加含有ActRIIA配位體之組合物。ActRIIA/活化素複合物之偵測及定量提供用於測定化合物在抑制(或增強)ActRIIA多肽與活化素之間的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各種濃度之測試化合物獲得之資料產生劑量反應曲線評估。此外，亦可進行對照分析以提供用於比較之基線。舉例而言，在對照分析中，將分離及純化活化素添加至含有ActRIIA多肽之組合物，且在不存在測試化合物之情況下將ActRIIA/活化素複合物之形成定量。應瞭解一般而言，反應物可摻合之次序可變化，且可同時摻合。此外，代替純化蛋白質，可使用細胞提取物及溶解物呈現適合之無細胞分析系統。

ActRIIA多肽與活化素之間的複合物形成可藉由多種技術偵測。舉例而言，複合物形成之調節可使用例如可偵測地標記之蛋白質，諸如放射性標記(例如^{32}P、^{35}S、^{14}C或^{3}H)、螢光標記(例如FITC)或以酶促方式標記之ActRIIA多肽或活化素，藉由免疫分析或藉由層析偵測

定量。

在某些實施例中，本文中涵蓋螢光偏振分析及螢光共振能量轉移(FRET)分析在直接或間接量測ActRIIA多肽與其結合蛋白之間的相互作用程度中之用途。此外，其他偵測模式，諸如基於光波導 (PCT公開案WO 96/26432及美國專利第5,677,196號)、表面電漿子共振(SPR)、表面電荷感測器及表面力感測器之彼等模式與本文所描述之許多實施例相容。

此外，亦稱為「雙雜交分析」之相互作用捕捉分析可用於鑑定破壞或增強ActRIIA多肽與其結合蛋白之間的相互作用之試劑。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)。在一特定實施例中，本文中涵蓋逆向雙雜交系統用於鑑定分解ActRIIA多肽與其結合蛋白之間的相互作用之化合物(例如小分子或肽)之用途。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。

在某些實施例中，本發明化合物藉由其與ActRIIA或活化素多肽相互作用之能力鑑定。化合物與ActRIIA或活化素多肽之間的相互作用可為共價或非共價。舉例而言，此類相互作用可在蛋白質水準下使用活體外生物化學方法，包括光交聯、放射性標記之配位體結合及親和性層析法(Jakoby W B等人, 1974, Methods in Enzymology 46: 1)鑑定。在某些情況下，化合物可在基於機制之分析(諸如偵測結合至活化素或ActRIIA多肽之化合物之分析)中篩選。此可包括固相或流體相結合作用。替代地，編碼活化素或ActRIIA多肽之基因可用報導子系統(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

佳藉由高通量篩選或用庫之個別成員對庫進行篩選。可使用其他基於機制之結合分析，例如偵測自由能變化之結合分析。結合分析可用固定至孔、珠粒或晶片或藉由固定抗體捕獲或藉由毛細電泳法解析之標靶進行。結合化合物可通常使用比色或螢光或表面電漿子共振偵測。

在某些態樣中，本文提供調節(刺激或抑制)骨骼形成及增加骨質量之方法及試劑。因此，任何鑑定之化合物可在整個細胞或組織中，活體外或活體內測試以確認其調節骨骼生長或礦化之能力。出於此目的，可利用此項技術中已知之各種方法。特定言之，可測試化合物增加骨骼轉換之能力。

舉例而言，ActRIIA或活化素多肽或測試化合物對骨骼或軟骨生長之影響可藉由在基於細胞之分析中量測Msx2之誘導或骨原細胞至骨母細胞之分化測定(參見例如Daluiski等人, Nat Genet. 2001, 27(1):84-8；Hino等人, Front Biosci. 2004, 9:1520-9)。基於細胞之分析之另一實例包括分析本發明ActRIIA或活化素多肽之成骨活性且在間葉細胞祖細胞及骨母細胞中測試化合物。為了說明，可構築表現活化素或ActRIIA多肽之重組腺病毒以感染多能間葉細胞祖細胞C3H10T1/2細胞、骨母細胞前體C2Cl2細胞及骨母細胞TE-85細胞。成骨活性隨後藉由量測鹼性磷酸酶、骨鈣化素及基質礦化之誘導測定(參見例如Cheng等人, J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52)。

本文亦提供量測骨骼或軟骨生長之活體內分析。舉例而言，Namkung-Matthai等人, Bone, 28:80-86 (2001)揭示在骨折之後的早期期間骨修復經研究之大鼠骨質疏鬆模型。Kubo等人, Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999)亦揭示在骨折之後的後期期間骨修復經研究之大鼠骨質疏鬆模型。Andersson等人, J. Endocrinol. 170:529-537描述小鼠骨質疏鬆模型，其中小鼠經切除卵巢，此使得小鼠失去實質上骨礦物質含量及骨礦物質密度，小樑骨損

失大約50%骨礦物質密度。骨密度可藉由投與諸如副甲狀腺激素之因子在切除卵巢的小鼠中增加。在某些態樣中，可使用此項技術中已知之骨折癒合分析。此等分析包括骨折技術、組織學分析及生物力學分析，其描述於例如美國專利第6,521,750號中，該美國專利為了其用於引起以及量測骨折程度之實驗方案及修復方法之揭示以全文引用的方式併入本文中。

1.7活化素II型受體信號傳導抑制劑之劑量

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為如章節1.5.1中所闡述之ActRIIA信號傳導抑制劑。在其他實施例中，ActRII抑制劑為如章節1.5.2中所闡述之ActRIIB信號傳導抑制劑。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑為ActRIIA信號傳導抑制劑與ActRIIB信號傳導抑制劑之組合。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑以足以實現0.2微克/公斤或0.2微克/公斤以上之血清濃度之時間間隔及量給藥，且1微克/公斤或2微克/公斤或2微克/公斤以上之血清水準為實現對骨密度及強度之顯著影響所需。給藥方案可經設計以達成在0.2與15微克/公斤之間，且視情況在1與5微克/公斤之間的血清濃度。在人類中，0.2微克/公斤之血清水準可用0.1 mg/kg或0.1 mg/kg以上之單一劑量實現且1微克/公斤之血清水準可用0.3 mg/kg或0.3 mg/kg以上之單一劑量實現。分子之觀測血清半衰期為約20與30天之間，實質上比大多數Fc融合蛋白長，且因此持續有效血清水準可例如藉由以0.2-0.4 mg/kg在每週或每兩週基礎上給藥實現，或較高劑量可與給藥之間的較長時間間隔一起使用。舉例而言，1至3 mg/kg之劑量可在每月或每兩月基礎上使用，且對骨骼之影響可充分持久使得僅每3、4、5、6、9、12或更多個月一次需要給藥。ActRII信號傳導抑制劑之血清水準可藉由熟習此項技術者已知之任何方式量測。舉例而言，可使用針對ActRII信號傳

導抑制劑之抗體來使用例如ELISA測定ActRII信號傳導抑制劑之血清水準。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之劑量在靜脈內0.01至3.0 mg/kg或皮下0.03至0.1 mg/kg範圍內。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之劑量為約0.01 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2.0 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3.0 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4.0 mg/kg、約4.5 mg/kg或約5.0 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之劑量為約10.0 mg/kg、約15.0 mg/kg、約20.0 mg/kg、約25.0 mg/kg或約30.0 mg/kg。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑之劑量在0.01 mg/kg與0.1 mg/kg之間、在0.1 mg/kg與0.3 mg/kg之間、在0.3 mg/kg與0.5 mg/kg之間、在0.3 mg/kg與0.8 mg/kg之間、在0.5 mg/kg與1.0 mg/kg之間、在1.0 mg/kg與2.0 mg/kg之間、在1.0 mg/kg與3.0 mg/kg之間、在2.0 mg/kg與3.0 mg/kg之間、在2.0 mg/kg與4.0 mg/kg之間、在3.0 mg/kg與5.0 mg/kg之間、在5.0 mg/kg與10.0 mg/kg之間、在10.0 mg/kg與15.0 mg/kg之間、在10.0 mg/kg與20.0 mg/kg之間、在15.0 mg/kg與20.0 mg/kg之間或在20.0 mg/kg與30.0 mg/kg之間。在某些實施例中，劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg或約1 g。在某些實施例中，劑量為約0.1 mg/kg。在某些實施例中，劑量為約0.3 mg/kg。在某些實施例中，劑量為約0.5 mg/kg。在某些實施例中，劑量為約0.7 mg/kg。

在某些實施例中，劑量為醫藥學上有效劑量。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg或約1 g或約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2

mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為約0.1 mg/kg。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為約0.3 mg/kg。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為約0.5 mg/kg。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為約0.7 mg/kg。

在某些實施例中，劑量為初始劑量。在某些實施例中，初始劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg或約1 g或約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg。在某些實施例中，醫藥學上有效劑量為約0.1 mg/kg。在某些實施例中，初始劑量為約0.3 mg/kg。在某些實施例中，初始劑量為約0.5 mg/kg。在某些實施例中，初始劑量為約0.7 mg/kg。在某些實施例中，初始劑量(i)每28天投與一次；或(ii)每42天投與一次。在某些實施例中，初始劑量每14天投與一次。在某些實施例中，初始劑量每21天投與一次。

在某些實施例中，初始劑量每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28天投與一次。在某些實施例中，初始劑量每1、2、3、4、5或6週投與一次。在某些實施例中，初始劑量每2週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg

且每1、2、3、4、5或6週投與一次。在某些實施例中，初始劑量在約0.3至約0.8 mg/kg之間且每2週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg且每1、2、3、4、5或6週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg且每2週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.3 mg/kg且每2週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.5 mg/kg且每2週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.7 mg/kg且每2週投與一次。在某些實施例中，初始劑量為約0.8 mg/kg且每2週投與一次。

在某些實施例中，劑量為經調整劑量。在某些實施例中，經調整劑量高於初始劑量。在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量高約2.5 mg、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、或約35 mg，或比初始劑量高約0.05 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.15 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.35 mg/kg、約0.4 mg/kg或約0.5 mg/kg。在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量更頻繁地投與。在某些實施例中，經調整劑量每5、10、15、20、25、28、30、35或40天投與。

在某些實施例中，經調整劑量低於初始劑量。在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量低約2.5 mg、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、或約35 mg，或比初始劑量低約0.05 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.15 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.35 mg/kg、約0.4 mg/kg或約0.5 mg/kg。在某些實施例中，經調整劑量比初始劑量較不頻繁地投與。在某些實施例中，經調整劑量每30、35、40、

42、50、60、70、80或90天投與。

在某些實施例中，劑量經由注射投與。在某些實施例中，劑量每28天投與一次或每42天投與一次。在某些實施例中，劑量連續及/或無限投與。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之活化素水準及/或活性相比，將個體之活化素水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，活化素為游離活化素，例如不與卵泡抑素、卵泡抑素樣3或抑制素相關之活化素。在某些實施例中，活化素為活化素A。在某些實施例中，活化素水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之Smad依賴性信號傳導相比，將個體之Smad依賴性信號傳導降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，Smad依賴性信號傳導藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考

群體)之Runx2水準及/或活性相比，將個體之Runx2水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，Runx2水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之Alp水準及/或活性相比，將個體之Alp水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，Alp水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之Snail水準及/或活性相比，將個體之Snail水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，Snail水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信

號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之磷酸化smad2水準及/或活性相比，將個體之磷酸化smad2水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，磷酸化smad2水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之磷酸化smad3水準及/或活性相比，將個體之磷酸化smad3水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，磷酸化smad3水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之尿蛋白水準及/或活性相比，將個體之尿蛋白水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，尿蛋白水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之Dkk1水準及/或活性相比，將個體之Dkk1水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，Dkk1水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之col1a1水準及/或活性相比，將個體之col1a1水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，col1a1水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之BSAP水準及/或活性相比，將個體之BSAP水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，BSAP水準及/或活性藉由如章節1.6

中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之CTX水準及/或活性相比，將個體之CTX水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，CTX水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之奧斯特里克斯水準及/或活性相比，將個體之奧斯特里克斯水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，奧斯特里克斯水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之ActRIIA水準及/或活性相比，將個體之ActRIIA水準及/或活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%

或至多100%。在某些實施例中，ActRIIA水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之克羅索水準及/或活性相比，將個體之克羅索水準及/或活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，克羅索水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之α-SMA水準及/或活性相比，將個體之α-SMA水準及/或活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，α-SMA水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考

群體)之MYOCD水準及/或活性相比，將個體之MYOCD水準及/或活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，MYOCD水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之Axin2水準及/或活性相比，將個體之Axin2水準及/或活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，Axin2水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之血管平滑肌蛋白水準相比，增加個體之血管平滑肌蛋白水準，諸如Sm22-α。在某些實施例中，血管平滑肌蛋白水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群

體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之Sm22-α水準及/或活性相比，將個體之Sm22-α水準及/或活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，Sm22-α水準及/或活性藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨體積相比，將個體之骨體積增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，骨體積藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之破骨細胞凹陷表面相比，將個體之破骨細胞凹陷表面減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，破骨細胞凹陷表面藉由如章節1.6中

所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨骼形成速率相比，維持個體之骨骼形成速率，或最低限度地增加或減少個體之骨骼形成速率，諸如增加或減少至多1%、2.5%、5%、10%或15%。在某些實施例中，骨骼形成速率藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨母細胞表面相比，維持個體之骨母細胞表面，或最低限度地增加或減少個體之骨母細胞表面，諸如增加或減少至多1%、2.5%、5%、10%或15%。在某些實施例中，骨母細胞表面藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之主動脈骨母細胞轉化相比，將個體之主動脈骨母細胞轉化減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，主動脈骨母細胞轉化藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨母細胞數目相比，將個體之骨母細胞數目減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、

60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，骨母細胞數目藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之骨母細胞表面比骨骼表面比率相比，將個體之骨母細胞表面比骨骼表面比率減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，骨母細胞表面比骨骼表面比率藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之破骨細胞數目相比，將個體之破骨細胞數目減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，破骨細胞數目藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之破骨細胞表面比骨骼表面比率相比，將個體之破骨細胞表面

比骨骼表面比率減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，破骨細胞表面比骨骼表面比率藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之小樑骨體積相比，將個體之小樑骨體積增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，小樑骨體積藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之小樑厚度相比，將個體之小樑厚度增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或

至多500%。在某些實施例中，小樑厚度藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之血管平滑肌功能相比，將個體之血管平滑肌功能增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，血管平滑肌功能藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之血管鈣化相比，將個體之血管鈣化減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，血管鈣化藉由如章節1.6中所描述之分析測定。在某些實施例中，根據本文所提供之方法投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之血管鈣水準相比，將血管鈣水準降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、

15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，血管鈣水準藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之主動脈鈣水準相比，將個體之主動脈鈣水準降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，主動脈鈣水準藉由如章節1.6中所描述之分析測定。在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之主動脈粥樣化中之鈣沈積物相比，將個體之主動脈粥樣化中之鈣沈積物減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，主動脈粥樣化中之鈣沈積物藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之CKD誘導之內皮細胞至間葉細胞轉化(EnMT)相比，將個體之EnMT減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、

40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，EnMT藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之心臟大小(例如心臟重量)相比，將個體之心臟大小(例如心臟重量)減少至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或至少10%，或至多1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或至少10%。在某些實施例中，心臟大小藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之分化血管平滑肌細胞水準相比，將個體之分化血管平滑肌細胞水準增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至少500%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或至多500%。在某些實施例中，分化血管平滑肌細胞水準藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之動脈硬度相比，將個體之升高之動脈硬度水準降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至

多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，動脈硬度藉由如章節1.6中所描述之分析測定。在某些實施例中，根據本文所提供之方法投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之動脈硬度相比，將個體之升高之動脈硬度水準降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，動脈硬度藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之礦物質接合速率相比，維持個體之礦物質接合速率，或最低限度地增加或減少個體之礦物質接合速率，諸如增加或減少至多1%、2.5%、5%、10%或15%。在某些實施例中，礦物質接合速率藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之高磷酸鹽血症相比，維持個體之高磷酸鹽血症，或最低限度地增加或減少個體之高磷酸鹽血症，諸如增加或減少至多1%、2.5%、5%、10%或15%。在某些實施例中，高磷酸鹽血症藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考

群體)之FGF23水準相比，維持個體之FGF23水準，或最低限度地增加或減少個體之FGF23水準，諸如增加或減少至多1%、2.5%、5%、10%或15%。在某些實施例中，FGF水準藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之腎纖維化相比，將個體之腎纖維化減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，腎纖維化藉由如章節1.6中所描述之分析測定。在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以與參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之腎小球硬化相比，將個體之腎小球硬化減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%，或至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至多100%。在某些實施例中，腎小球硬化藉由如章節1.6中所描述之分析測定。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以將本文提供之生物標記(例如Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、尿蛋白及/或ActRIIA)中之一或多者之水準標準化。舉例而言，在某些

實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以將本文提供之生物標記(例如Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、尿蛋白及/或ActRIIA)中之一或多者之水準增加或降低至參考群體(例如如章節1.6中所描述之參考群體)之各別生物標記之水準。

在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以治療及/或預防個體之心臟肥大。在某些實施例中，心臟肥大藉由如章節1.6中所描述之分析測定。在某些實施例中，根據本文所提供之方法向個體投與之ActRII信號傳導抑制劑之劑量足以治療及/或預防個體之LVH。

當結合本文提供之劑量(例如ActRII信號傳導抑制劑之劑量或第二活性劑之劑量)使用時，字「約」係指在參考數字之1%、5%或10%內之任何數字。

在某些實施例中，如本文所描述之ActRII信號傳導抑制劑根據本文所提供之方法皮下或靜脈內向個體投與。

在某些實施例中，0.13 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)皮下向根據以每14天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。在某些實施例中，0.26 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)皮下向根據以每14天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。在某些實施例中，0.1 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)靜脈內向根據以每14天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。在某些實施例中，0.2 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)靜脈內向根據以每14天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。在某些實施例中，0.3 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)皮下向根據以每28天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。在某些實施例中，0.5 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ

ID NO:7)皮下向根據以每28天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。在某些實施例中，0.7 mg/kg之ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)皮下向根據以每28天一次之時間間隔提供之方法治療的個體投與。

1.8組合療法

在某些實施例中，本文所提供之方法與第二醫藥活性劑組合進行。可藉助於治療之個體組分之同時、依序或單獨給藥來實現此類組合治療。另外，當作為此類組合療法之組分投與時，ActRII信號傳導抑制劑及第二醫藥活性劑可為協同的，以使得組分中之任一者或兩者之日劑量可與將通常作為單一療法給出之任一組分之劑量相比降低。替代地，當作為此類組合療法之組分投與時，本文提供之ActRII信號傳導抑制劑及第二醫藥活性劑可為添加性的，以使得組分中之每一者之日劑量與將通常作為單一療法給出之任一組分之劑量類似或相同。

在某些實施例中，本文提供之ActRII信號傳導抑制劑在與第二醫藥活性劑相同之日子投與。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑在第二醫藥活性劑之前一、二、三或三天以上投與。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑在第二醫藥活性劑之後一、二、三或三天以上投與。在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑在第二醫藥活性劑之一、二、三或三週以上內投與。

在某些實施例中，第二醫藥活性劑為Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素(例如游離活化素)、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯之拮抗劑，諸如抗體或其片段、小分子信號傳導抑制劑、反義核酸、較小干擾核酸、顯性負性蛋白或其片段。在某些實施例中，第二醫藥活性劑為克羅索、α-SMA、MYOCD、Axin2及/或Sm22-α之促效劑，諸如抗體或其片段或小分子。

在某些實施例中，第二醫藥活性劑為用於治療心血管疾病、血

管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病的活性劑，諸如醛固酮信號傳導抑制劑、血管緊張素II受體阻斷劑、β-阻斷劑、鈣離子通道阻斷劑、降低膽固醇之藥物、地高辛、利尿劑、影響肌收縮力之療法、鉀或鎂、血管舒張劑及/或華法林。

在某些實施例中，第二醫藥活性劑為用於治療慢性腎病之活性劑，諸如血管緊張素II受體阻斷劑、β-阻斷劑、鈣離子通道阻斷劑、凝乳酶信號傳導抑制劑、利尿劑、血管舒張劑、紅血球生成素療法、鐵替代療法及/或維生素D。

在某些實施例中，本文所提供之方法與用於治療或改善心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病及/或與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病及/或慢性腎病之方法組合進行。

1.9醫藥組合物

在某些實施例中，活化素-ActRII拮抗劑(例如ActRII多肽)用與本文所描述之方法一起使用之藥學上可接受的載劑調配。舉例而言，ActRII多肽可單獨或作為醫藥調配物(治療組合物)之組分投與。本發明化合物可以用於人類或獸醫學之任何便利方式調配以便投與。ActRII可為ActRIIA或ActRIIB。

在某些實施例中，本文提供之治療方法包括全身性地或局部以植入物或裝置形式投與組合物(包含ActRII信號傳導抑制劑)。當投與時，用於本文提供之用途之治療組合物呈無熱原質之生理上可接受形式。除ActRII拮抗劑外之亦可視情況包括於如上文所描述之組合物中之治療適用試劑可與本發明化合物(例如ActRII多肽，諸如ActRIIA及/或ActRIIB多肽(參見章節1.5))同時或依序投與。

通常ActRII拮抗劑將非經腸投與。適用於非經腸投與之醫藥組合

物可包含一或多種ActRII多肽以及一或多種醫藥學上可接受之無菌等張水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液，或可在即將使用之前復原成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、溶質(其使調配物與預期接受者之血液等張)或懸浮劑或增稠劑。可在用於本文所描述之方法之醫藥組合物中使用的適合水性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)及其適合混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯(諸如油酸乙酯)。可例如藉由使用包衣材料(諸如卵磷脂)、維持所需粒徑(在分散液之情況下)及使用界面活性劑來維持適當流動性。

此外，組合物可以用於遞送至標靶組織位點(例如骨骼)之形式囊封或注射。在某些實施例中，用於本文所描述之方法之組合物可包括能夠將一或多種治療化合物(例如ActRIIA多肽)遞送至標靶組織位點(例如骨骼)，為發育組織提供結構且最佳能夠再吸收至身體中之基質。舉例而言，基質可提供ActRIIA多肽之緩慢釋放。此等基質可由目前用於其他植入醫學應用中之材料形成。

基質材料之選擇係基於生物相容性、可生物降解性、機械特性、裝飾性外觀及界面特性。本發明組合物之特定應用將限定合適調配物。用於組合物之可能基質可為可生物降解及化學限定之硫酸鈣、磷酸三鈣、羥磷灰石、聚乳酸及聚酸酐。其他可能材料為可生物降解的且生物學上充分限定，諸如骨骼或皮膚膠原蛋白。其他基質由純蛋白質或細胞外基質組分構成。其他可能基質為不可生物降解的且以化學方式限定，諸如燒結羥基磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽或其他陶瓷。基質可由上述類型之材料(諸如聚乳酸及羥磷灰石或膠原蛋白及磷酸三鈣)中之任一者之組合構成。生物陶瓷可在組合物中，諸如在鈣-鋁酸鹽-磷酸鹽及處理中改變以改變微孔尺寸、粒徑、粒子形狀及可生

物降解性。

在某些實施例中，用於本文所描述之方法之組合物(包含ActRII信號傳導抑制劑)可經口投與，例如呈以下形式：膠囊、扁囊劑、丸劑、錠劑、口含錠(使用調味基劑，通常蔗糖及阿拉伯膠或黃蓍)、散劑、顆粒，或水性或非水性液體中的溶液或懸浮液形式，或水包油或油包水液體乳液形式，或酏劑或糖漿形式，或片劑(使用惰性基劑，諸如明膠及丙三醇，或蔗糖及阿拉伯膠)及/或漱口水形式及其類似形式，其各含有預定量之試劑作為活性成分。試劑亦可以藥團、舐劑或糊劑形式投與。

在用於經口投與之固體劑型(膠囊、錠劑、丸劑、糖衣藥丸、散劑、顆粒及其類似物)中，本文所描述之一或多種治療化合物可與一或多種醫藥學上可接受之載劑(諸如檸檬酸鈉或磷酸二鈣)及/或以下中之任一者混合：(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、褐藻酸鹽、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-瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、褐藻酸、某些矽酸鹽及碳酸鈉；(5)溶液延遲劑，諸如石蠟；(6)吸收加速劑，諸如第四銨化合物；(7)濕潤劑，諸如鯨蠟醇及甘油單硬脂酸酯；(8)吸附劑，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、錠劑及丸劑之情況下，醫藥組合物亦可包含緩衝劑。亦可採用諸如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及其類似物之賦形劑將類似類型之固體組合物用作軟填充明膠膠囊及硬填充明膠膠囊中之填充劑。

用於經口投與之液體劑型包括醫藥學上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酏劑。除活性成分之外，液體劑型可含有

常用於此項技術中之惰性稀釋劑(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(尤其為棉籽油、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之脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀釋劑外，口服組合物亦可包括佐劑，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。

除活性化合物之外，懸浮液亦可含有懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂醇、聚氧化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-瓊脂及黃蓍及其混合物。

本文所描述之組合物亦可含有佐劑，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，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸及其類似物來確保對微生物作用之防止。亦可需要在組合物中包括等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似物。此外，可注射醫藥形式之延長吸收可藉由包括延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來達成。

應瞭解給藥方案將由主治醫師考慮改變本文所描述之化合物(例如ActRII多肽，諸如ActRIIA及/或ActRIIB多肽(參見章節1.5))之作用的各種因素確定。各種因素包括(但不限於)需要形成之骨骼重量之量、骨密度損失程度、骨骼破壞位點、損傷骨骼之狀況、個體之年齡、性別及飲食、可促成骨質流失之任何疾病之嚴重性、投與時間及其他臨床因素。視情況，劑量可隨用於復原之基質類型及組合物中之化合物類型變化。其他已知生長因子至最終組合物中之添加亦可影響劑量。可藉由骨骼生長及/或修復之週期評估，例如X射線(包括DEXA)、組織形態學測定及四環素標記監測進程。

在某些實施例中，本文提供用於活體內產生ActRII多肽之基因療

法。此類療法將藉由引入ActRII多核苷酸序列至細胞或具有如上文所列之病症之組織中來實現其治療效果。ActRII多核苷酸序列之遞送可使用重組表現載體(諸如嵌合病毒)或膠體分散系統實現。對於ActRII多核苷酸序列之治療遞送較佳為使用靶向脂質體。ActRII多肽可為ActRIIA及/或ActRIIB多肽(參見章節1.5))。

可用於如本文中教示之基因療法之各種病毒載體包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘，或較佳地RNA病毒，諸如反轉錄病毒。較佳地，反轉錄病毒載體為鼠或禽類反轉錄病毒之衍生物。其中可插入單一異體基因之反轉錄病毒載體之實例包括(但不限於)：莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus，MoMuLV)、哈威鼠肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus，HaMuSV)、鼠乳腺腫瘤病毒(MuMTV)及勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus，RSV)。多種額外反轉錄病毒載體可併入有多種基因。所有此等載體可轉移或併入針對可選擇標記之基因以使得可鑑定及產生轉導細胞。反轉錄病毒載體可藉由連接例如糖、糖脂或蛋白質製成標靶特異性。較佳靶向藉由使用抗體實現。熟習此項技術者將認識到特異性多核苷酸序列可插入反轉錄病毒基因組中或連接至病毒包膜以允許含有ActRII多核苷酸之反轉錄病毒載體之標靶特異性遞送。在一較佳實施例中，載體靶向骨骼或軟骨。

替代地，組織培養細胞可藉由習知磷酸鈣轉染，直接用編碼反轉錄病毒結構基因gag、pol及env之質體轉染。此等細胞隨後用含有相關基因之載體質體轉染。所得細胞將反轉錄病毒載體釋放至培養基中。

ActRII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、奈米囊劑、微球、珠粒及包括水包油乳化液、微胞、混合微胞及脂質體之基於脂質之系統。用於本文所描述之方法中之較佳膠體系統為脂質體。脂質體為適用作活體外及活體內遞

送媒劑之人造膜囊泡。RNA、DNA及完整病毒粒子可囊封在水性內部內且以生物學上活性形式遞送至細胞(參見例如Fraley等人, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。使用脂質體媒劑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。脂質體之組成通常為磷脂之組合，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、離子強度及二價陽離子之存在而定。

適用於脂質體產生之脂質之實例包括磷脂醯基化合物，諸如磷脂醯甘油、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、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。基於例如器官特異性、細胞特異性及細胞器特異性，脂質體之靶向亦為可能的且在此項技術中已知。

在某些實施例中，ActRII信號傳導抑制劑在醫藥組合物中為實質上純。具體言之，醫藥組合物中之至多20%、10%、5%、2.5%、1%、0.1%或至多0.05%化合物為除ActRII信號傳導抑制劑及醫藥學上可接受之載體外的化合物。

1.10套組

本文提供一種套組，其包含一或多個填充有一或多種試劑之容器以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之一或多種生物標記(例如Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之一種生物標記(例如Runx2、Alp、Snai1、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及

尿蛋白)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中Runx2之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中Alp之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中Snail之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中磷酸化smad2之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中Dkk1之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中colla1之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中活化素之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中BSAP之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中CTX之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中奧斯特里克斯之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中克羅索之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中α-SMA之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中MYOCD之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中Sm22-α之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中磷酸化smad3之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中尿蛋白之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中ActRIIA之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲

得之樣品中Axin2之水準。

在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之兩種生物標記(例如兩種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之三種生物標記(例如三種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之四種生物標記(例如四種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之五種生物標記(例如五種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之六種生物標記(例如六種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、col1a1、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水

準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之七種生物標記(例如七種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之八種生物標記(例如八種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之九種生物標記(例如九種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十種生物標記(例如十種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十一種生物標記(例如十一種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之

個體獲得之樣品中本文所描述之十二種生物標記(例如十二種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十三種生物標記(例如十三種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十四種生物標記(例如十四種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十五種生物標記(例如十五種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十六種生物標記(例如十六種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十七種生物標記(例如十七種選自由

Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，套組包含一或多種試劑以測定自本文所描述之個體獲得之樣品中本文所描述之十八種生物標記(例如十八種選自由Runx2、Alp、Snail、磷酸化smad2、Dkk1、collal、活化素、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、Sm22-α、磷酸化smad3、ActRIIA、Axin2及尿蛋白組成之群的生物標記)之水準。在某些實施例中，用以測定生物標記之水準之一或多種試劑如章節1.6.1中所描述。在某些實施例中，套組進一步包含ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)。在某些實施例中，套組進一步包含第二容器，該第二容器包含ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7)。

2.實例

本文中呈現之實例展現在某些形式之慢性腎病中Runx2、Alp、BSAP、CTX及奧斯特里克斯mRNA水準升高且克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及Sm22-α mRNA水準可能降低。此等實例進一步展現用活化素配位體捕捉之治療降低Runx2、Alp、CTX、ActRIIA及/或奧斯特里克斯mRNA水準且增加克羅索、α-SMA、MYOCD、Axin2及/或Sm22-α mRNA水準，其與血管鈣化減少相關。因此，本文提供之實例展現Runx2、Alp、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α可用作治療以下各者之生物標記：心血管疾病、血管鈣化、與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起之心血管疾病、與腎病相關及/或由腎病引起之心血管疾病、動脈硬度水準升高、與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起之心血管疾病、LVH及/或與LVH相關及/或由LVH引起之心血管疾病。

2.1實例1.用針對2A型活化素受體之配位體捕捉治療CKD-MBD

CKD-MBD可包含血管鈣化、骨營養不良及在其開始時刺激骨胳骨細胞FGF23分泌及高磷酸鹽血症，隨後在過程中發展以進一步刺激血管鈣化。此實例展現抑制藉由CKD誘導之ActRIIA信號傳導(經由活化素IIA類型受體(ActRIIA)之TGFβ超家族信號傳導之成員)抑制血管鈣化及預防心臟肥大。

2.1.1方法

在2型糖尿病ldlr-/-小鼠，血管鈣化之高脂肪餵養模型中在14週齡時誘導具有高磷酸鹽血症及GFR之60%降低之CKD (CKD-3)。一些CKD小鼠用在22週齡時開始每週腹膜內注射之2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理，且在28週研究。量測主動脈Ca^{2+}水準、骨母細胞及血管平滑肌蛋白之表現、骨胳組織形態測定術及微CT成像、血清化學及FGF23及PTH水準。藉由ELISA、RT-PCR及西方墨點量測活化素、卵泡抑素及抑制素水準。

2.1.2結果

循環活化素水準在兩種不同腎病模型中增加：間質纖維化及X相關Alport (圖1A及圖1B)。此外，活化素A mRNA水準在CKD模型之主動脈及腎臟中增加(圖2)。活化素水準在血管及循環中增加而無卵泡抑素之變化(圖2A、圖2B及圖2C)。CKD刺激藉由用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑(mActRIIA-Fc；參見例如美國專利第8,173,601號，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中)處理降低至22週水準以下之血管鈣化(圖3A、圖3B、圖3C、圖3D、圖5A及圖5B)，且預防心臟肥大。CKD誘導主動脈Runx2、奧斯特里克斯及Alp訊息及蛋白之表現，且此等藉由用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理反轉(分別對於Runx2及Alp mRNA，圖4A及圖4B；對於Runx2蛋白，圖4F)。CKD減少克羅索及Sm22-α訊息及

蛋白質，且用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理使克羅索及Sm22-α表現標準化(分別對於克羅索及Sm22-α mRNA，圖4C及圖4E；對於蛋白質，圖4F)。此外，CKD減少MYOCD訊息(圖4D)。此外，CKD減少α-平滑肌肌動蛋白(肌動蛋白α-平滑肌)蛋白(圖4F)。此外，CKD刺激增加之鈣水準(其藉由用mActRIIA-Fc處理降低) (圖6A)。骨體積藉由用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理增加，且破骨細胞凹陷表面減少，但骨骼形成速率及骨母細胞表面不受影響(圖6B、圖6C及圖6D)。高磷酸鹽血症及FGF23水準未由用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理而改變。

用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理抑制骨骼再吸收且增加骨體積。用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑mActRIIA-Fc處理抑制Smad依賴性信號傳導，阻斷主動脈骨母細胞轉化，增加血管平滑肌蛋白水準且減少CKD刺激之血管鈣化及心臟肥大。

2.2實例2.慢性腎病(CKD)刺激造成血管鈣化之主動脈內皮細胞至間葉細胞轉化(ENMT)且經活化素配位體捕捉抑制

慢性腎病中為血管鈣化之基礎之分子機制不完全地理解。然而，活化素水準在CKD刺激之血管鈣化中增加。為了評估活化素在CKD刺激之血管鈣化中之作用，在慢性腎病小鼠模型中在動脈粥樣硬化及2型糖尿病模型中使用結合多種TGF-β超家族配位體之重組融合蛋白。ActRIIA-Fc融合蛋白由連接至免疫球蛋白1 (IgG1) Fc結構域之活化素受體IIA (ActRIIA)之細胞外結構域組成且該蛋白質充當如活化素A、活化素B、生長分化因子-11 (GDF11)及骨形態生成蛋白-10 (BMP-10)之TGF-β家族成員之配位體捕捉劑。

先前已經顯示腎病藉由在腎臟修復期間產生全身性Wnt抑制而造

成血管鈣化。此實例展現CKD刺激之Wnt抑制之血管影響為刺激血管活化素以及誘導Smad依賴性EnMT，且活化素受體配位體捕捉劑抑制EnMT及血管鈣化。

2.2.1方法

針對譜系追蹤及血管鈣化在小鼠模型中誘導具有升高之Wnt抑制劑之CKD。藉由ELISA、RT PCR及西方墨點量測活化素、卵泡抑素及抑制素水準。細胞譜系追蹤在育種成內皮特異性Tie2-Cre小鼠之GNZ小鼠(Stoller等人, Genesis, 2008)中進行。含有GNZ之基因嵌入之小鼠在Cre介導之重組之後表現核GFP及lacZ。

2.2.2結果

在腎病及CKD刺激之血管鈣化小鼠模型中活化素水準在血管及循環中增加而無卵泡抑素水準之變化。CKD誘導GFP及lacZ在GNZ之動脈外膜及中膜細胞中之表現；Tie2-Cre CKD小鼠與GNZ比較；Tie2-Cre小鼠具有正常腎功能，其中GFP及lacZ限於主動脈及內皮。Tie2為內皮譜系特異性受體，且此展現CKD誘導主動脈EnMT (圖7A、圖7B、圖7C及圖7D)。CKD刺激之主動脈EnMT產生降低之血管平滑肌功能、骨母細胞轉化及鈣化。用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑(mActRIIA-Fc；參見例如美國專利第8,173,601號，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中)處理抑制Smad依賴性信號傳導，阻斷主動脈骨母細胞轉化，增加血管平滑肌功能且減少CKD刺激之血管鈣化。因此，CKD誘導血管活化素及EnMT，且用2A型活化素受體(mActRIIA)配位體捕捉劑處理減少活化素信號傳導，抑制血管反分化、骨母細胞轉化及血管鈣化。

2.3實例3.用遞增劑量治療之血液透析個體中之骨質量及血管鈣化之初始信號搜尋定量電腦斷層攝影術結果

高轉換腎性骨營養不良(ROD)表現為增加之皮層孔隙率、較高小

樑骨質量及增加之骨折風險。所研究之用於校正血液透析(HD)個體之貧血之活化素A RIIA-IgG1融合蛋白配位體捕捉劑ActRIIA-Fc阻斷活化素A信號傳導且可減少破骨細胞生成且促進骨骼中之骨母細胞成熟。在HD個體中之目前分析使用定量電腦斷層攝影術(QCT)評估ActRIIA-Fc對骨礦物質密度(BMD)及血管鈣化之影響。

2.3.1方法

將用ActRIIA信號傳導抑制劑治療之對紅血球生成素刺激劑(ESA)反應之血液透析個體清除ESA影響直至血色素(Hb)<10 g/dL，隨後隨機化以用在以下劑量下之ActRIIA信號傳導抑制劑皮下每28天持續高達8個劑量週期治療：0.3 mg/kg (n=9)，0.5 mg/kg (n=8)，0.7 mg/kg (n=6)，或安慰劑(PBO；n=7)關於對Hb、骨礦物質密度(BMD)及骨骼轉換之生物標記之影響評估個體。治療失敗(Hb <9 g/dL)用ESA及/或紅血球輸注救援。在基線及在225天治療期之後獲得髖及腰椎之定量電腦斷層攝影(QCT)。在基線及在劑量週期3、5及7之後量測生物標記、BSAP及CTX。

在基線及在225天治療期之後獲得髖、腰椎及腹部主動脈之QCT。個體仰臥安置在Mindways校準體模(模型3；Mindways Software, Inc., Austin, TX)上。使用標準軟組織核重建2.5 mm之片層厚度及512 × 512基質。使用Mindways分析軟體(版本5.0.3)評估體積BMD (vBMD)。測定L1-4內2根脊椎(通常L1-2)之小樑vBMD (mg/cm^3)。針對總髖、股骨頸及轉節區之皮層、小樑及整體骨骼區室之vBMD分析左近端股骨。

使用半自動將與L1頂部至L4底部相鄰之區域內鈣化之面積及體積分段之軟體評估腹部主動脈之血管鈣化。片之數目及位置在每名個體之訪視次數中維持。蓋斯頓及平方根轉換之總體積記分如蓋斯頓等人, *J Am Coll Cardiol.* 1990; 15:827-832及Hokanson等人, *AJR AM J*

Roentgenol. 2004;182:1327-1332中所描述測定。較低總蓋斯頓及平方根轉換之總體積記分(mm^3)指示血管鈣化(VC)之較低水準。

所有影像品質控制及盲化分析藉由PAREXEL成像(PAREXEL International Corp. Waltham, MA)集中進行。

在基線及在劑量週期1、3、5及7之後量測生物標記，包括骨特異性鹼性磷酸酶(BSAP)、原膠原1型N端前肽(P1NP)及C端1型膠原蛋白端肽(CTX)。

2.3.2結果

總共31名個體經隨機化且接受一種以上劑量之研究藥物。

表2.隨機化個體及QCT分析子集

		ActRIIA-Fc		
個體，n	**安慰劑**	**0.3 mg/kg**	**0.5 mg/kg**	**0.7 mg/kg**
隨機化且接受≥ 1種劑量之研究藥物	8	9	8	6
在基線及第225天之QCT量測值	3	6	5	2

個體安置描述於圖8中，包括在基線及第225天進行配對QCT量測之個體。

大多數個體在需要救援之治療失敗(一般由於Hb <9 g/dL)之後停止研究治療；無個體由於不良事件(AE)而停止治療。

在進行配對QCT量測之16名個體中，9名在治療期期間需要救援療法，其中8名在前3個劑量週期內需要救援。

在進行配對QCT量測之個體中，基線人口統計及臨床特徵一般在治療組之間類似(表3)；然而在亦為最年輕組之安慰劑組中存在實質上較長透析時間。在基線生物標記及蓋斯頓記分方面，組之間亦存在差異(表4)。

表3.進行配對QCT量測之個體之基線人口統計及臨床特徵

		ActRIIA-Fc		
	安慰劑 n=3	0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2
年齡，平均值，歲	54.0	57.3	60.8	69.0
女性，n (%)	0 (0.0)	4 (66.7)	0 (0.0)	1 (50.0)
人種，n (%)				
白人	1 (33.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	1 (50.0)
黑人	1 (33.0)	3 (50.0)	2 (40.0)	1 (50.0)
亞洲人	1 (33.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
種族，n (%)				
美籍西班牙人	0 (0.0)	2 (33.0)	3 (60.0)	1 (50.0)
非美籍西班牙人	3 (100.0)	4 (66.7)	2 (40.0)	1 (50.0)
透析後體重，平均值，kg	70.4	80.3	79.4	84.4
身體質量指數，平均值，kg/m^2	25.4	27.7	26.9	29.2
糖尿病，n (%)	2 (66.7)	5 (83.3)	5 (100.0)	2 (100.0)
副甲狀腺切除術，n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
透析時間，平均值，月	101.2	43.3	22.4	11.3
非鈣磷酸鹽結合劑，n (%)*	3 (100.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	0 (0.0)
基於鈣之磷酸鹽結合劑，n (%)*	1 (33.3)	4 (66.7)	4 (80.0)	2 (100.0)
擬鈣劑，n (%)*	1 (33.3)	2 (33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
1,25-OH維生素D類似物，n (%)	2 (66.7)	5 (83.3)	2 (40.0)	2 (100.0)

表4.進行配對QCT量測之個體之平均基線生物標記、區域BMD及蓋斯頓記分

		ActRIIA-Fc		
	安慰劑 n=3	0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2
基線全PTH，pg/mL	261.4	104.8	135.5	100.4
BSAP，μg/L	28.3	18.0	13.2	7.5
P1NP，ng/mL	623.7	376.2	468.4	308.0
CTX，pg/mL	3,417.7	2,062.5	2,266.8	1,377.0
總髖整體BMD，mg/cm^3	279.4	306.2	268.9	285.4
股骨頸皮層BMD，mg/cm^3	653.1	666.9	593.1	566.5
平均脊椎(L1,L2)BMD，mg/cm^3	123.1	125.6	149.1	150.6
VC總蓋斯頓記分*	8,665.0	9,472.7	3,618.5	823.2

PTH=副甲狀腺激素。

*較低蓋斯頓記分指示較低血管鈣化水準。

表5提供髖整體、股骨頸皮層、髖皮層及腰椎區域BMD量測值中相對於基線之變化百分比。

表5.基線及髖整體、股骨頸皮層及腰椎區域BMD中相對於基線之變化百分比

		ActRIIA-Fc		
	安慰劑 n=3	0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2
總髖整體				
基線BMD，mg/cm^3	279.4	306.2	268.9	285.4
相對於基線BMD之變化%(n)	-0.2 (3)	2.5 (5)	4.0 (5)	-1.8 (1)
股骨頸皮層				
基線BMD (mg/cm^3)	653.1	666.9	593.1	565.5
相對於基線BMD之變化%(n)	-0.9 (3)	-1.4 (5)	1.6 (5)	3.0 (1)
總髖，皮層				
基線BMD (mg/cm^3)	708.6	668.4	647.3	635.6
相對於基線BMD之變化%(n)	-0.1 (3)	-1.1 (5)	0. 5 (5)	2.7 (1)
平均腰椎(L1、L2)				
基線BMD (mg/cm^3)	123.1	125.6	149.1	150.6
相對於基線BMD之變化%(n)	12.6 (3)	8.0 (6)	0.5 (5)	-2.7 (2)

皮層骨之2%增加可降低骨折風險。ACTRIIA信號傳導抑制劑治療與具有股骨頸皮層骨之大於或等於2%增加之個體比例之劑量依賴性增加相關(表5及圖9A)。

在高轉換ROD中，小樑骨質量增加(亦即較不良品質骨骼)藉由腰椎BMD量測，與一般群體相比無ESKD中之椎骨骨折率降低。用ACTRIIA治療防止腰椎中小樑骨質量增加(表5及圖9B)。

在腹部主動脈總蓋斯頓記分中相對於基線之變化提供於表6中。總蓋斯頓記分及平方根轉換之總體積記分之變化類別顯示於圖9及表7中。

表6.基線及腹部主動脈總蓋斯頓記分及平方根轉換之總體積記分中相對於基線之變化

	安慰劑 n=3	ActRIIA-Fc 0.3 mg/kg n=6	ActRIIA-Fc 0.5 mg/kg n=5	ActRIIA-Fc 0.7 mg/kg n=2
腹部主動脈總蓋斯頓記分				
基線總蓋斯頓記分	8,665	9,473	3,619	823
相對於基線總蓋斯頓記分之變化	1,050.4	8,578.9	225.7	43.4
相對於基線總蓋斯頓記分之變化%	58.4	24.9	17.3	3.4
平方根轉換之總體積記分				
基線總體積平方根，mm^3	52.0	46.2	33.1	16.9
相對於基線總體積平方根之變化，mm^3	4.5	11.1	1.2	0.4

*較低總蓋斯頓及平方根轉換之總體積記分指示血管鈣化之較低水準。

十一名個體具有分佈在10與10,000之間的基線蓋斯頓記分。五名個體可認作為在基線處之離群值(低離群值：0.0、1.1及1.4個蓋斯頓記分；高離群值：21,033及44,356個蓋斯頓記分)。因此，蓋斯頓記分在無離群值的情況下分析(表7及圖10)。

表7.基線及排除5個離群值之總蓋斯頓記分之變化

	安慰劑 n=1	ActRIIA-Fc 0.3 mg/kg n=4	ActRIIA-Fc 0.5 mg/kg n=4	ActRIIA-Fc 0.7 mg/kg n=2
重定基線總蓋斯頓記分，排除5個離群值	4,960	3,120	4,523	823
相對於基線總蓋斯頓記分之變化，排除5個離群值	2,711.3	287.7	282.0	43.4
相對於基線之變化%，排除5個離群值	54.7	9.0	5.0	3.4

*較低總蓋斯頓及平方根轉換之總體積記分指示血管鈣化之較低水準。

藉由暴露於ActRIIA信號傳導抑制劑之持續時間分析個體。藉由暴露狀態分析個體：接受高達3種劑量之ActRIIA-Fc個體，不論劑量水準(n=6)；及接受> 3種劑量之ActRIIA-Fc個體，不論劑量水準(n=7)。安慰劑組(n=3)未變化。除性別及蓋斯頓記分外，重要基線特徵一般在接受≤3種劑量之ActRIIA-Fc之彼等個體與接受>3種劑量之彼等個體之間類似(表8)。對VC之暴露影響在所有ActRIIA-Fc個體中(表9)以及當排除離群值時(表10)保持完整。

表8.個體之經ActRIIA-Fc暴露之基線人口統計及臨床特徵

	ActRIIA-Fc	
	≤3種劑量 n=6	>3種劑量 n=7
年齡，平均值，歲	59.0	61.7
女性，n (%)	4 (66.7)	1 (14.3)
人種，n (%)		
白人	3 (50.0)	4 (57.1)
黑人	3 (50.0)	3 (42.9)
亞洲人	0 (0.0)	0 (0.0)
身體質量指數，平均值，kg/m^2	25.7	29.3
糖尿病，n (%)	5 (83.3)	7 (100.0)
透析時間，月	31.3	24.0
基於鈣之磷酸鹽結合劑，n (%)	4 (66.7)	6 (85.7)
擬鈣劑，n (%)	1 (16.7)	1 (14.3)
1,25-OH維生素D類似物，n (%)	4 (66.7)	5 (71.4)
基線全PTH，平均值，pg/mL	104.5	125.7
BSAP，平均值，μg/L	19.8	10.0
P1NP，平均值，ng/mL	432.2	374.6
CTX，平均值，pg/mL	2,410.3	1,714.4
VC總蓋斯頓記分，平均值	8,350	3,782
體積之平方根，mm^3	38.2	35.3

表9.基線及藉由ActRIIA-Fc暴露之在總蓋斯頓記分及平方根轉換之總體積記分中之相對於基線的變化*

	ActRIIA-Fc	
	≤3種劑量 n=6	>3種劑量 n=7
基線總蓋斯頓記分	8,350	3,782
相對於基線總蓋斯頓記分之變化	8,461.4	274.3
相對於基線總蓋斯頓記分之變化%	33.7	5.8
基線總體積平方根，mm^3	38.2	35.3
相對於基線總體積平方根之變化，mm^3	10.6	1.4

*較低總蓋斯頓記分及平方根轉換之總體積記分指示血管鈣化之

較低水準。

表10.基線及藉由ActRIIA-Fc暴露之在排除5個離群值之總蓋斯頓記分中相對於基線之變化*

	ActRIIA-Fc	
	≤3種劑量 n=3	>3種劑量 n=7
重定基線總蓋斯頓記分，排除5個離群值	1,914	3,782
相對於基線總蓋斯頓記分之變化，排除5個離群值	148.4	274.3
相對於基線之變化%，排除5個離群值	7.5	5.8

*較低總蓋斯頓記分及平方根轉換之總體積記分指示血管鈣化之較低水準。

評估骨骼轉換生物標記。在基線處安慰劑組具有最高PTH、BSAP、P1NP及CTX水準(表4)。在磷、PTH、FGF-23或硬骨素水準中未觀測到相對於基線之一致變化，除在安慰劑組中PTH在所有時間點比在基線低(-15.2至-100.7 ng/L)以外。對於骨骼生物標記，在形成標記BSAP及P1NP之變化百分比中不可見明顯變化；再吸收標記CTX之變化百分比顯示於圖11中。

接受0.5 mg/kg ACTRIIA信號傳導抑制劑之更多個體具有再吸收標記CTX之有意義、持久性的減少。

2.3.3結論

在30名隨機化個體中，13名進行配對QCT評估(分別對於PBO、0.3 mg/kg及0.5 mg/kg，n=3、6及4)。對於PBO、0.3 mg/kg及0.5 mg/kg，相對於基線之相對BMD變化分別為-0.9%、-1.4%及+1.9%股骨頸皮層及+12.6%、+8.0%及-1.9%腰椎。0.5 mg/kg之生物標記變化表明有利抗吸收效果。

此等資料展現ActRIIA-Fc 0.5 mg/kg之新興劑量效果，其似乎反轉高轉換ROD對皮層及鬆質骨之影響。PBO結果正如所料。

2.4實例4.腎病產生之循環腎修復因子引起心血管疾病

腎病與極高死亡率相關，極高死亡率與腎病產生心血管疾病有關(Sarnak, M.J.等人, 2003. Circulation 108:2154-2169)。進行中之REGARDS項目之輔助研究證實，在持續冠狀動脈事件(心臟缺血或非致命性心肌梗塞)之患者中，與高風險組(吸菸者、糖尿病、高膽固醇血症)之19%相比，歷經4年之中位隨訪，第二心血管事件之發生率在患有腎病之患者中為35%，且高風險組中各種原因之死亡之發生率為慢性腎病(CKD)組之一半(Baber, U.,等人, 2013. Am Heart J 166:373-380)。與腎病相關之增加之心血管風險的原因在於在2006年命名之症候群，慢性腎病-礦物質骨骼病症(CKD-MBD (Moe, S.,等人, 2006. Kidney Int 69:1945-1953)。在CKD-MBD中，已經發現三種新穎心血管風險因子(Block, G.A.,等人, 1998. Am J Kidney Dis 31:607-617；Blacher, J.,等人, 2001. Hypertension 38:938-942；Gutierrez, O.M.,等人, 2008. New Engl J Med 359:584-592)，且其風險因子狀態在普通人群中係經確認(Dhingra, R.,等人, 2007. Arch Intern Med 167:879-885；Matsushita, K.,等人, 2014. Journal of the American Society of Nephrology；Dalal, M.,等人, 2011. European Journal of Endocrinology 165:797-803)。此等為高磷酸鹽血症、血管鈣化及升高之纖維母細胞生長因子23 (FGF23)水準。CKD-MBD係在由血管反分化/鈣化、骨營養不良、損失克羅索及FGF23分泌增加(Fang, Y.,等人, 2014. Kidney Int 85:142-150)組成之CKD早期(2期)開始(Fang, Y.,等人, 2014. Kidney Int 85:142-150；Pereira, R.C.,等人, 2009. Bone 45:1161-1168；Fang, Y.,等人, 2009. J Am Soc Nephrol 20:36A；Hu, M.C.,等人, 2011. J Am Soc Nephrol 22:124-136)，但雖然早期腎衰竭中CKD-MBD病因已經有進展(Hu, M.C.,等人, 2011. J Am Soc Nephrol 22:124-136；Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763；de Oliveira, R.B.,等人, 2013. Nephrology Dialysis Transplantation 28:2510-2517；Sabbagh, Y.

2012. J. Bone Miner. Res. 27:1757-1772)，其大多是未知的。

已經展現腎病再活化在疾病刺激之腎修復期間參與腎發生之發育程序(Surendran, K.,等人, 2002. Am J Physiol Renal Physiol 282:F431-F441；Surendran, K.,等人, 2005. J Am Soc Nephrol 16:2373-2384；Maeshima, A.,等人, 2001. Cytokine & Growth Factor Reviews 12:289-298；Terada, Y.,等人, 2003. Journal of the American Society of Nephrology 14:1223-1233；Kawakami, T.,等人, 2013. J Pathol 229:221-231)。在於腎修復中再活化之腎源性因子中，Wnt (無翅及整合之混成詞)家族對於管狀上皮復原重要(Terada, Y.,等人, 2003. Journal of the American Society of Nephrology 14:1223-1233；Kawakami, T.,等人, 2013. J Pathol 229:221-231；Rinkevich, Y.,等人, 2014. Cell Reports 7:1270-1283)。在控制Wnt功能中，典型信號傳導以轉錄方式誘導Wnt抑制蛋白之家族之表現，該等Wnt抑制蛋白為用以限制Wnt刺激至自分泌或旁分泌因子之距離的分泌蛋白(Niida, A.,等人, 2004. Oncogene 23:8520-8526；Niehrs, C. 2006. Oncogene 25:7469-7481；Reya, T.,等人, 2003. Nature 423:409-414；Chamorro, M.N.,等人, 2004. The EMBO Journal 24:73-84；Gonzalez-Sancho, J.M., 2004. Oncogene 24:1098-1103)。Wnt抑制劑為循環因子，且Wnt抑制劑家族包括迪科科普夫(Dkk)、分泌型捲曲相關蛋白(Sfrp)、硬骨素、sostDoc 1、新月體、Wnt抑制因子1 (Wif1)及Icat (Niehrs, C. 2006. Oncogene 25:7469-7481)。各種形式之腎病增加Wnt抑制劑之腎表現且增加其在循環中之水準(Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763；Surendran, K.,等人, 2005. J Am Soc Nephrol 16:2373-2384)。

在CKD、Dkk1中在循環中升高之重要Wnt抑制劑之中和抑制CKD誘導之血管反分化、血管鈣化及腎性骨營養不良(Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763)。此效果出人意料，因為在血管平滑

肌中Wnt信號傳導涉及刺激骨母細胞轉化及血管鈣化(Al-Aly, Z.,等人, 2007. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:2589-2596；Shao, J.S.,等人, 2005. Journal of Clinical Investigation 115:1210-1220)。然而，近期研究展現主動脈Wnt7b之Dkk1介導之抑制刺激smad介導之主動脈內皮細胞-間葉細胞轉化(EnMT)及血管鈣化(Cheng, S.-L.,等人, 2013. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 33:1679-1689)。EnMT為參與心臟瓣膜、心臟隔膜及主動脈根部發育之發育生理過程(Eisenberg, L.M.,及Markwald, R.R. 1995. Circulation Research 77:1-6；Camenisch, T.D.,等人, 2002. Developmental Biology 248:170-181)，且其可能(Zeisberg, E.M.,等人, 2007. Nat Med 13:952-961)或可能不(Moore-Morris, T.,等人, 2014. The Journal of Clinical Investigation 124:2921-2934)在各種成人疾病病況中造成心臟纖維化。此因子研究在腎病期間參與嘗試腎修復之其他因子是否衍生自TGFβ超家族且在CKD期間在循環中增加。

2.4.1方法

2.4.1.1產生動物模型

動脈粥樣硬化*低密度脂蛋白受體*缺乏型*(ldlr-/-)*雄性(C57Bl/6J背景)購自Jackson Laboratories且在12週齡開始喂入高脂肪飲食(42%來自脂肪之熱量) (Teklad號)。小鼠肥胖，在22週齡耐胰島素，在28週齡有糖尿病及有高膽固醇血症。

如先前(Davies, M.R.,等人, 2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567；Davies, M.R.,等人, 2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928)所述利用兩步程序產生慢性腎病。在出生後12週經由2 cm側腹切口將電灼法施加至右側腎臟，接著為在14週齡進行左側腎全切除術。改變灼燒術之強度以產生藉由在20週齡之菊糖清除率確認的中度(CKD-3)腎損傷(圖12A)。對照動物接受假操作，其中將合適腎臟暴露且移動但不以

任何其他方式處理。在此研究中使用五組小鼠(圖15B)。第一組為喂入常規飲食之野生型C57Bl/6J小鼠(WT)。此為用於規範對照值之正常腎功能及飲食組。第二組為喂入高脂肪飲食且假操作之*ldlr-/-*小鼠(假處理組)。此組具有正常腎功能，且其充當對照組以測定腎病之影響。第三組為喂入高脂肪飲食，GFR等於人類CKD 3期降低之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3)，在22週安樂死，基線血管鈣化組(CKD-3)。第四組為在22週開始一週兩次接受媒劑之皮下注射直至在28週安樂死之患有CKD-3之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3 V)。第五組為患有CKD-3，接受在22週開始之mActRIIA-Fc (Celgene, Summit, NJ)，10 mg/kg一週兩次之皮下注射直至在28週安樂死之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3 mActRIIA-Fc)。

使用之CKD之第二模型為X相關奧爾波特氏症候群之鼠同源物，該症候群為在基因中缺乏IV型膠原蛋白之α5鏈COL4A5 (Rheault, M.N.,等人, 2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474)。此為自發性腎病之模型，且其在整個結果中使用以確認腎切除誘導之CKD之影響。育種對購自Jackson Laboratories且經育種用於實驗。在出生之後200天時半合子雄性自發地罹患與人類CKD 3-4期類似之腎病。

使用之CKD之第三模型為在用於細胞譜系追蹤之轉殖基因小鼠系，GNZ小鼠中之腎切除，其類似於ldlr-/-方案(圖14)。GNZ報導子雌性小鼠(Stoller, J.Z.,等人, 2008. Genesis (New York, N.Y. 2000) 46:200-204)及Tek-Cre轉殖基因雄性小鼠(Koni, P.A.,等人, 2001. The Journal of Experimental Medicine 193:741-754) 購自Jackson Laboratories且經育種以產生GNZ/Tek-Cre+小鼠用於實驗。GNZ/Tek-Cre同胎仔畜充當陰性對照。小鼠基因分型藉由使用由製造商針對GNZ及Tek-Cre小鼠品系建議之特異性引子進行。在所有情況下，在麻醉下進行安樂死。腹膜內麻醉(甲苯噻嗪13 mg/kg及氯胺酮87

mg/kg)用於所有程序。在第二次手術之後1週獲取隱靜脈血液樣品以評估基線手術後腎功能。在處死時，藉由心內穿刺獲取血液，且整塊剝離心臟及主動脈。

2.4.1.2菊糖清除

根據製造商說明(BioPal Inc., Worcester, MA)進行在20週或26週之菊糖清除(若安樂死在28週)。

2.4.1.3化學鈣化定量

主動脈及心臟在處死時剝離，且所有額外組織藉由在剝離顯微鏡下鈍器剝離移除。組織在60℃下乾燥20-24小時，稱重且用研杵及研缽碾碎成粉末。鈣在4℃下溶離在1N HCL中持續24小時。使用甲酚酞胺羧錯合劑方法(Sigma, St Louis)，根據製造商之說明分析溶離液之鈣含量，且結果針對乾組織重量校正。

2.4.1.4血液測試

在血液抽取之日藉由標準自動分析儀實驗室方法分析血清之血液脲氮(BUN)、鈣及磷酸鹽。在ELISA分析中測定血漿活化素(Fitzgerald Industries, Acton, MA)、卵泡抑素(MYBIOSOURCE Inc., San Diego, CA)及卵泡抑素-樣3 (MYBIOSOURCE Inc.)水準。用ELISA (R&D Systems, Minn., MN)分析血清Dkk1水準。對於ELISA分析，藉由隱靜脈或心臟穿刺在安樂死時抽取血液。在收集時所有血液樣品放在冰上。藉由在6000 rpm下5分鐘及14000 rpm下2分鐘，皆在4℃下之2步離心製造血小板貧血EDTA血漿樣品。樣品冷凍儲存在-20℃或-20℃以下直至使用。

2.4.1.5組織學及免疫組織化學

主動脈、腎臟及心臟組織固定在10%中性緩衝福馬林中隔夜，隨後在4℃下轉移至70%乙醇中，嵌入石蠟中且製備5微米切片。將載玻片在二甲苯中去石蠟且在分級乙醇系列中脫水且隨後復水。根據標準

方案，使用馬森(Mason)三色染色法染色偵測腎臟及心臟纖維化且使用茜素紅染色偵測鈣化(Gregory, C.A.,等人, 2004. *Analytical Biochemistry* 329:77-84)。對於免疫組織化學染色，內源過氧化酶用含3% H_2O_2之甲醇阻斷15 min。非特異性結合用抗生素蛋白及生物素阻斷劑(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)阻斷30 min，隨後用3%正常驢血清阻斷20 min。在用PBS洗滌之後，將載玻片用初級抗體在4℃下培育隔夜，且接著用生物素標記之二級抗體(Vector laboratories)在室溫下培育一小時，隨後使用DAB套組(SK-4100, Vector laboratories)進行抗生蛋白鏈菌素結合之過氧化酶染色。對於雙重免疫螢光染色，將切片阻斷在20%山羊血清中且依序用第一初級及二級抗體及第二初級及二級抗體，使用山羊抗兔Alexa 488及Alexa 568二級抗體1:400 (Life Technologies，A11008及A11011)或用於根據製造說明信號放大之TSA套組(Life Technologies，T 20932)染色。當來自相同物種之初級抗體用於雙重染色時，載玻片在第二染色之前在微波中在檸檬酸鹽緩衝液中加熱5 min (Toth及Mezey, 2007)。初級抗體在此研究中用於免疫染色：兔多株抗ActRIIA抗體1:250 (Abcam，ab 135634)、兔多株抗抑制素βA抗體1:100 (Santa Cruz，sc-50288)、兔多株抗CD31抗體1:50 (Abcam，ab28364)及兔多株抗GFP抗體1:1000 (Abcam，ab6556)。

2.4.1.6 RT-PCR

使用RNeasy Mini套組(Qiagen, Valencia, CA)自主動脈及細胞培養物提取RNA。根據製造商之說明，使用來自Bio-Rad (Hercules， Ca)之iScript cDNA合成套組將1 μg總RNA經DNA酶處理，反轉錄。使用Vector NTI (Invitrogen, Grand Island, NY)或Primer Express軟體設計引子。使用Perkin-Elmer DNA熱循環儀進行反應。在如上進行之反轉錄之後，使用StepOne Plus即時PCR儀器(AB)、來自Sigma (St. Louis)之

SYBR Green及來自Invitrogen之PCR套組進行即時。各反應一式三份地在95℃，45秒及60℃，30秒下及60秒在72℃下進行持續40次循環。此接著為熔融循環，其由溫度自60℃至95℃逐步增加組成。在各基因之解離曲線中觀測到單個主峰，證實PCR產物之特異性。將Ct數(臨限值)設定在PCR之指數期內且用於計算相關基因之表現水準。B2m用作內標且用於使值標準化。由Ct對log cDNA稀釋度(對應於log複本數)組成之標準曲線藉由放大對應於未知量之擴增子之cDNA之連續稀釋度產生。陰性對照藉由如下進行：藉由在RT-PCR之前沸騰5 min以確保基因組DNA不擴增來使反轉錄酶失活。

2.4.1.7免疫墨點法(西方分析)

自小鼠之腎臟及主動脈藉由含有蛋白酶抑制劑混合液(Santa Cruz)之RIPA溶解緩衝液(Thermo Scientific)製備全細胞溶解蛋白。將溶解物(20 μg)負載在8-12% SDS-PAGE凝膠中且用針對以下各者之抗體進行免疫墨點法：抑制素β-A (Santa Cruz)、α-微管蛋白(Santa Cruz)、snai 1 (Cell Signaling)、α-SMA (Sigma)、Runx2 (Cell Signaling)、MYOCD (Santa Cruz)、ACVRL1 (Origene)、ACVR1 (Cell Signaling)、Erk1/2 (Cell Signaling)、磷酸化-Erk1/2 (Cell Signaling)、ACVR1B (Origene)、Col1a1 (Santa Cruz)、Smad2/3 (Cell Signaling)或磷酸化-Smad2/3 (Cell Signaling)。在免疫沈澱(IP)分析中，使用相同全細胞溶解蛋白。為了減少非特異性結合，使用預洗滌蛋白質A瓊脂糖珠粒(Cell Signaling)將樣品預清潔。經預清潔之樣品用磷酸化-絲胺酸抗體(Abcam)培育隔夜。隨後在蛋白質A瓊脂糖珠粒上捕獲IP-抗體複合物，且藉由免疫墨點法分析來偵測蛋白質。

2.4.1.8人類研究

個體在提供根據赫爾辛基宣言(Declaration of Helsinki)之準則之知情同意書之後參與。若個體超過18歲且具有3期CKD (使用腎病飲

食改良研究方程式(Levey, A.S.,等人, 1999. Ann Intern Med 130:461-470)，估計之GFR為30-59 ml/min/1.73m^2)，則其符合條件。排除準則包括妊娠、骨骼疾病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、舒張功能障礙或重度高血壓。研究小組成員鑑定符合包括準則且對研究有興趣之其診所患者。回顧醫療記錄以在參與之前確定最終適用性。在基線訪視時及在12個月之治療之後自各個體獲得血液樣品。在獲得血液樣品之當日時間存在個體間變化。自各樣品產生血漿之等分試樣且立即用於生物化學測試或在80℃下冷凍。使用市售ELISA套組，根據製造商之說明(R&D Systems, Minneapolis, MN)一式兩份量測活化素之血漿水準。

2.4.1.9統計學

使用ANOVA進行統計分析。所有資料表示為平均值±SD，除非在圖例中另外說明。組之間的差異使用Fisher LSD方法在此之後評估且認為在$p < 0.05$下顯著。使用Sigma Stat統計軟體(Point Richmond, CA)進行分析。所有組之資料表示7-15之「n」。對於即時PCR分析，在各實驗組中使用最少3個樣品。使用非配對t-測試比較用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠與媒劑處理之CKD-3 V小鼠或假操作小鼠(假處理組)。在圖6中，方框表示中位數及四分位數範圍(自第25個至第75個百分位)，且誤差杠顯示在第25個百分位以下及第75個百分位以上之四分位數範圍之1.5倍。使用用於多重比較之ANOVA Holm-Sidak方法比較平均值，$p<0.05$作為顯著差異之重要水準。

2.4.2結果

2.4.2.1 CKD模型中之腎功能

在三種實驗模型中誘導類似於人類3期CKD (CKD-3)之CKD。第一模型為CKD刺激之動脈粥樣硬化血管鈣化模型：*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠(Fang, Y.,等人, 2014. Kidney Int 85:142-150；Fang, Y.,等人, 2014.

J Am Soc Nephrol 25:1760-1763；Davies, M.R.,等人, 2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567；Davies, M.R.,等人, 2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928；Lund, R.J.,等人, 2004. J Am Soc Nephrol 15:359-369；Mathew, S.,等人, 2008. J Am Soc Nephrol 19:1092-1105. PMCID:PMC2396927；Mathew, S.,等人, 2007. J Am Soc Nephrol 18:122-130；Mathew, S.,等人, 2008. J Am Soc Nephrol 19:1509-1519. PMCID:PMC2488263)。藉由菊糖清除率及藉由BUN水準量測之腎功能在*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠中降低至人類3期CKD之水準，如章節2.4.1.1中所描述，且此等小鼠下文稱為CKD-3 (圖12A及圖12B)。此外，CKD-3小鼠為高血磷的(表11)，此符合人類3b-4期CKD。CKD之第二模型為在缺乏IV型膠原蛋白之α5鏈(Col4α5) (奧爾波特氏症候群)之小鼠及人類中產生之自發性CKD (Rheault, M.N.,等人, 2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474)。Col4α5缺乏小鼠在年齡為200天時具有等效於人類3-4期CKD之菊糖清除率降低及BUN升高(圖12C及圖12D)。第三模型，GNZ小鼠中之CKD-3於章節2.4.1.1中及在以下描述。

表11.各個組動物中之血清生物化學參數.

參數	第1組 野生型	第2組 假處理組	第3組 **CKD-3**	第4組 **CKD-3**	第5組 **CKD-3**
品系	C57/BJ6	*Ldlr -/-*	*Ldlr -/-*	*Ldlr -/-*	*Ldlr -/-*
飲食	普通食物	高脂肪	高脂肪	高脂肪	高脂肪
手術	無	假處理	CKD	CKD	CKD
出生後之週數	28	28	28	28	28
處理	無	無	媒劑	mActRIIA-Fc	LaC03
N	12	15	14	15	12
BUN (mg/dL)	24.0 ± 4.6	20.6 ± 3.7	37.7 ± 7.6	36.5 ± 5.8	35.6 ± 9.1
Ca (mg/di)	8.3 ± 1.8	8.9 ± 0.9	9.4 ± 0.8	8.8 ± 0.3	8.8 ± 1.4
磷(mg/di)	8.9 ± 0.2	7.9 ± 2.3	11.0 ± 1.6	11.8 ± 1.2	10.5 ± 2.1

2.4.2.2活化素水準及主動脈IIA型活化素受體(ActRIIA)

研究在CKD中腎修復以刺激TGFβ超家族成員之循環水準之能

力。循環活化素水準在CKD模型中增加(圖13A及圖13B)。分析腎臟及主動脈組織之活化素A (抑制素βA (Inhba)之均二聚體)之mRNA。Inhba mRNA藉由CKD在腎臟及主動脈中誘導(圖13C)，且蛋白質水準在腎臟中增加(圖13D)。針對TGFβ超家族II型受體之誘導自患有CKD-3之小鼠分析主動脈，該等受體為由II型及I型 (ALK)受體構成之超家族受體雜多聚體之配位體結合組分。在*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠中產生之CKD-3誘導活化素II型受體A (ActRIIA)在主動脈血管平滑肌中之上調(圖13E)。活化素與調節抑制因子卵泡抑素及卵泡抑素樣3 (fstL3)相關(Welt, C.,等人, 2002. Experimental Biology and Medicine 227:724-752)，其循環水準(圖13F及圖13G)及組織水準不受CKD-3影響。循環中卵泡抑素、fstL3及抑制素相對於活化素A水準(>5000pg/ml)之化學計量(620pg/ml之總數，加400pg/ml未經量測之抑制素(Sharpe, R.M.,等人, 1999. Journal of Andrology 20:94-101))表明CKD產生顯著游離活化素水準，此為使得活化素A成為CKD中之循環因子之病理性事件。

2.4.2.3 CKD中之主動脈內皮細胞-間葉細胞轉化

CKD之第三實驗模型用於此等研究。GNZ小鼠用於細胞譜系追蹤(Stoller, J.Z.,等人, 2008. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 46:200-204)，且GNZ小鼠在移除上游*loxP*側接終止序列後表現核定位之綠色螢光蛋白及β半乳糖苷酶(*G*FP/LacZ) (圖14A)。為了移除GNZ小鼠中之*loxP*位點，其在酪胺酸激酶Tek (Tie2)啟動子/強化子之引導下用表現Cre重組酶之Tek-Cre小鼠育種。因為Tie2為內皮譜系特異性血管生成素受體，GNZ/Tek-Cre+小鼠在內皮譜系細胞中表現細胞核及細胞質GFP(圖14A) (Moore-Morris, T.,等人, 2014. The Journal of Clinical Investigation 124:2921-2934)。在GNZ/Tek-Cre+小鼠中，用細胞核DAPI染色共定位之主動脈GFP限於用CD31生物標記來標記之內皮細胞(圖14B，參見箭頭)。當CKD-3在GNZ/Tek-Cre+小鼠中產生時，除

內皮細胞以外，主動脈中膜及外膜中之細胞展現GFP染色，顯示此等細胞經由內皮細胞-間葉細胞轉化(EnMT)衍生自內皮細胞譜系(圖14C、14D，參見箭頭)。為了進一步分析CKD是否刺激EnMT，在自發性CKD之模型，奧爾波特氏症候群小鼠中檢查參與EnMT之轉錄因子Snai 1之表現。Snai 1早期(在75 doa)在CKD過程中上調(圖14E)，符合峰值活化素水準之時序(參見以下)。

2.4.2.4在CKD中抑制ActRIIA信號傳導之血管效果

利用由融合至IgG1之Fc結構域之ActRIIA細胞外結構域構成之配位體捕捉劑(圖23A) (本文中稱為mActRIIA-Fc)。圖23B描繪用於在血管鈣化模型中利用mActRIIA-Fc之實驗設計，其使用允許藉由CKD-3刺激之血管鈣化在開始mActRIIA-Fc之前發展八週之處理方案。使用此方案，用ActRIIA配位體捕捉劑處理CKD-3小鼠減少*ldlr-/-*高脂肪餵養CKD-3小鼠中CKD-3刺激之主動脈Runx2表現及主動脈鹼性磷酸酶(ALP)表現(圖25A)。Runx2及ALP表現皆表示ActRIIA信號傳導及主動脈中藉由mActRIIA-Fc處理反轉之骨母細胞轉化之生物標記的可能下游影響。主動脈平滑肌22α (Sm22-α) (分化血管平滑肌細胞之生物標記)藉由CKD-3減少且藉由mActRIIA-Fc刺激。CKD-3引起降低之主動脈心肌素(MYOCD)表現(血管平滑肌細胞特異性轉錄因子)，但心肌素不受mActRIIA-Fc處理影響。已經與血管鈣化相關(Lim, K.,等人, 2012. Circulation 125:2243-2255)之主動脈克羅索表現與腎臟相比極低(資料未顯示)。關於CKD-3及mActRIIA-Fc處理對圖25A中之mRNA之主動脈蛋白質水準之影響，CKD增加主動脈Runx2水準且mActRIIA-Fc使主動脈Runx2水準標準化(圖25B)。CKD降低α平滑肌肌動蛋白(αSMA) (分化血管平滑肌細胞之另一生物標記)之主動脈水準，且mActRIIA-Fc處理增加αSMA之主動脈水準(圖25B)。心肌素水準未經CKD或mActRIIA-Fc處理改變。

2.4.2.5減少之ActRIIA信號傳導對血管鈣化之影響

在動脈粥樣硬化及2型糖尿病模型(Al-Aly, Z.,等人, 2007. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:2589-2596；Towler, D.A.,等人, 1998. Journal of Biological Chemistry 273:30427-30434)，如上文所描述之有消融CKD之*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠中研究血管鈣化之CKD刺激。在CKD-3媒劑處理小鼠(CKD-3 V)中CKD-3引起主動脈粥樣化中鈣沈積物之累積(圖15A)，其不存在於用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3 R)中，且主動脈組織鈣含量降低至在野生型小鼠中觀測之水準，顯著低於mActRIIA-Fc處理開始時存在之彼等水準(CKD-3) (圖15B)。

2.4.2.6減少之ActRIIA信號傳導對CKD刺激之心臟病之影響

在血管鈣化模型中研究心臟病之CKD刺激。CKD-3 V小鼠具有增加之心臟重量，其藉由mActRIIA-Fc處理反轉(圖16A)，但未藉由碳酸鑭處理反轉(CKD-3 L(Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763.))，且CKD-3 V誘導輕度心臟肥大(圖16B)。然而，雖然不存在心臟纖維化之跡象(圖16C)，但存在肌細胞肥大之跡象，其藉由mActRIIA-Fc處理反轉。

因為CKD中血管鈣化及心臟肥大關聯之一種機制為經由較大動脈硬度，使用先前報導之方法(Wagenseil, J.E.,等人, 2009. *Circulation Research* 104:1217-1224；Wagenseil, J.E.,等人, 2005. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 289:H1209-H1217)量測血管硬度及血壓。在*ldlr-/-*高脂肪餵養動脈粥樣硬化小鼠中CKD-3未產生頸動脈或主動脈之血管硬度(圖19A及19B)或血壓升高(表12)。此外，在用針對Dkk1之中和抗體(Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763)處理之CKD-3小鼠中Dkk1中和在不存在硬度增加之情況下不對主動脈硬度有影響。

表12. 28週大小鼠之生理心血管參數.

	WT	假處理組	CKD-3 V	CKD-3 Dkk1 mAb
SBP	108.9±1.1	111.9±4.7	100.4±4.6	110.7±4.8
DBP	77.27±1.0	78.56±2.2	69.14±3.1	77.55±3.6
脈搏壓	31.63±0.3	33.32±2.5	31.27±2.1	33.1±1.9
心跳速率	547.1±4.7	501.2±17.4	505.6±14.3	558.6±11.2

SBP=收縮血壓，DBP=舒張血壓。值以平均值±平均標準誤差形式呈現。N=4-6隻小鼠/組。

2.4.2.7主動脈及腎臟及腎臟纖維化中之ActRIIA信號傳導

藉由TGFβ超家族之典型信號轉導涉及配位體結合至II型受體，活化其絲胺酸/蘇胺酸激酶活性且刺激I型受體，Alk激酶之關聯及磷酸化(參見圖20中之圖解表示)。存在七種經TGFβ超家族利用之Alk激酶，且Alk4 (ActRIB)為最常與活化素/ActRIIA信號傳導相關之I型受體(Abe Y,等人, 2004. Growth Factors (Chur, Switzerland) 22:105-110)。在來自CKD-3小鼠模型之腎臟勻漿中，Alk4磷酸化未增加，與先前研究(Antsiferova, M.,及Werner, S. 2012. Journal of Cell Science 125:3929-3937)一致(圖18A)。相比之下，磷酸化smad 2經CKD-3增加且經mActRIIA-Fc降低(圖18A)，指示另一Alk受體在CKD中在腎活化素信號傳導中之作用。在具有間質腎炎之患病CKD-3腎臟中，Col1A1上調且mActRIIA-Fc降低Col1a1水準(圖18A)，符合藉由mActRIIA-Fc誘導之磷酸化smad 2之減少。此外，存在藉由mActRIIA-Fc校正之在CKD-3 V小鼠中誘導之腎克羅索表現之主要降低(圖18B)。因此，分析其中活化素在CKD-3 V中表現之腎區室且鑑定在小管周圍肌纖維母細胞中，但不在上皮細胞中之重鏈表現。

在主動脈平滑肌中，偵測Alk4及Alk1 (圖18A)，但不偵測Alk5或Alk2。Alk4及Alk1之水準不受CKD-3影響。然而，CKD-3未增加主動脈磷酸化smad 2/3水準，mActRIIA-Fc亦未降低該等水準(圖18A)。然而，非典型ActRIIA信號傳導(圖20)之分析指示map激酶(磷酸化

Erk1/2)未經CKD活化亦未經mActRIIA-Fc抑制且p38及JNK之血管平滑肌水準極低。主動脈肌動蛋白2水準亦極低，且未經CKD-3刺激。Axin2水準為典型Wnt信號傳導之標準生物標記。然而，因為Dkk1為典型Wnt信號傳導之轉錄標靶，分析腎臟及主動脈中之Dkk1水準作為Wnt活性之生物標記，展現mActRIIA-Fc處理在CKD-3小鼠中降低腎Dkk1水準(圖18C)，產生血漿Dkk1水準之顯著降低(圖18C)。此外，主動脈Dkk1水準經CKD-3增加且經mActRIIA-Fc抑制(圖18C)。此指示腎及血管平滑肌Wnt信號傳導及Dkk1之全身性釋放經活化素抑制而抑制。因此，在CKD信號中經由增加之血管ActRIIA活化之Wnt信號傳導及刺激動脈粥樣硬化鈣化升高循環活化素。

2.4.2.8臨床前研究轉變成人類病理生理學及臨床

如圖19中所示，與健康對照相比，在患有CKD 3期之患者群組中血清活化素水準增加。

2.4.3結論

此實例展現活化素為參與在CKD期間在循環中增加之腎修復的第二因子。不受理論束縛，結果展現活化素表現在患病腎臟中增加，釋放至循環中且刺激主動脈血管平滑肌反分化及骨母細胞轉化(其藉由內皮細胞至間葉細胞轉化促成)，且此等影響在CKD刺激之動脈粥樣硬化鈣化及心臟肥大中達到頂點。CKD上調在肌纖維母細胞中之腎活化素表現且經由增加腎纖維化刺激腎病之進程。抑制ActRIIA信號傳導抑制主動脈中之骨母細胞轉化及動脈粥樣硬化鈣化。抑制ActRIIA信號傳導抑制心臟肥大及腎纖維化。ActRIIA配位體捕捉劑mActRIIA-Fc對早期CKD-MBD症候群之影響類似針對Dkk1之單株抗體在CKD刺激之血管鈣化中之彼等影響(Fang, Y.,等人, 2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763)。此等資料展現在患病腎臟中抑制ActRIIA信號傳導減少Wnt活化及循環Wnt抑制劑。此外，在血管平滑肌中，活化

素刺激Wnt活性，其經mActRIIA-Fc抑制。因此，兩種腎臟發育因子Wnt及活化素之再活化在CKD中產生循環Wnt抑制劑及活化素，引起血管及心臟病。此為腎病直接引起心血管疾病且腎病過程之考慮不能與腎修復及隨之而來的心血管疾病刺激分開的論證。

此外，此實例展現腎活化素表現在三種慢性腎病模型中增加，產生超過循環中活化素抑制劑之水準的增加之循環活化素。循環活化素經由ActRIIA受體刺激信號轉導，產生主動脈血管平滑肌反分化、骨母細胞轉化及動脈粥樣硬化斑鈣化。此等影響由於循環活化素，如由缺少主動脈中之活化素蛋白水準增加證實，儘管CKD誘導主動脈活化素mRNA增加(圖13B)。不受理論束縛，此等資料展現血管活化素信號傳導經CKD經由藉由腎臟產生內分泌活化素刺激。

因為EnMT為Smad介導之過程(Cooley, B.C.,等人, 2014. Science Translational Medicine 6:227ra234)，其藉由包括TGFβ、骨形態生成蛋白(BMP)、活化素/抑制素及生長及分化因子(GDF)之TGFβ超家族成員活化(Piek, E.,等人, 1999. The FASEB Journal 13:2105-2124)，針對作為受體之配位體結合組分之TGFβ超家族II型受體水準之變化分析患有CKD-3之血管鈣化模型之主動脈。IIA型活化素受體(ActRIIA)在主動脈血管平滑肌中上調。投與作為配位體捕捉劑(mActRIIA-Fc)之具有IgG1之Fc結構域的融合蛋白中之ActRIIA細胞外結構域展現ActRIIA信號傳導之抑制產生主動脈平滑肌細胞中骨母細胞轉化之抑制、血管平滑肌細胞基因表現之刺激及CKD刺激之動脈粥樣硬化模型中主動脈鈣化之反轉。此外，在譜系追蹤小鼠模型中CKD刺激EnMT。然而，活化素功能之主要位點似乎在血管平滑肌中，其中ActRIIA表現增加。

心臟肥大(尤其左心室)在CKD中高度盛行(Moran, A.,等人, 2008. American Journal of Kidney Diseases 52:839-848；Park, M.,等人, 2012. Journal of the American Society of Nephrology 23:1725-1734)。此外，

動脈粥樣硬化血管鈣化模型之特徵在於心臟肥大(圖16)。然而，模型中心臟肥大之產生與CKD刺激之血管硬度(Townsend, R.R. 2015. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 24:47-53 10.1097/MNH.0000000000000086；Merx, M.W.,等人, 2005. Journal of the American Society of Nephrology 16:3357-3364)、高血壓及心臟重塑作用之常見範例機械地不同，因為動脈粥樣硬化CKD-3小鼠(*ldlr-/-*高脂肪餵養糖尿病小鼠)未展示血管硬度亦未展示高血壓。因為mActRIIA-Fc在不存在FGF23水準變化之情況下校正心臟肥大(圖19)，CKD-3小鼠中之心臟肥大不太可能由於FGF23 (Faul, C.,等人, 2011. *J Clin Invest* 121:4393-4408)。

總之，不受理論束縛，此實例展現第二因子參與在CKD期間在循環中增加且造成心血管疾病之腎修復。不受理論束縛，實例展現活化素表現在患病腎臟中增加，釋放至循環中且刺激主動脈血管平滑肌反分化及骨母細胞轉化(其藉由內皮細胞至間葉細胞轉化促成)，且此等影響在CKD刺激之動脈粥樣硬化鈣化及心臟肥大中達到頂點。CKD上調在肌纖維母細胞中之腎活化素表現且經由增加腎纖維化刺激腎病之進程。抑制ActRIIA信號傳導抑制主動脈中之骨母細胞轉化及動脈粥樣硬化鈣化。抑制ActRIIA信號傳導抑制心臟肥大及腎纖維化。ActRIIA配位體捕捉劑mActRIIA-Fc對早期CKD-MBD症候群之影響顯示在患病腎臟中抑制ActRIIA信號傳導減少Wnt活化及循環Wnt抑制劑。因此，不受理論束縛，兩種腎臟發育因子Wnt及活化素之再活化在CKD中產生循環Wnt抑制劑及活化素，引起血管及心臟病；因此腎病造成心血管疾病。

2.5實例5：腎臟損傷/修復經由全身性WNT抑制及活化素刺激血管疾病

2.5.1背景

在此實例中呈現之結果係關於在實例4 (章節2.4)中呈現之結果。

在腎臟修復期間腎病藉由產生全身性Wnt抑制及活化素分泌引起動脈粥樣硬化血管鈣化。慢性腎病(CKD)之血管影響為Wnt抑制與活化素受體功能之活化素誘導之調節的互相作用。

2.5.2方法

針對譜系追蹤及血管鈣化在小鼠模型中誘導具有升高之Wnt抑制劑，尤其Dkk1，及活化素之CKD且允許在奧爾波特氏小鼠中自發地產生。藉由ELISA、RT-PCR及西方墨點量測活化素、Dkk1、2A型活化素受體(ActRIIA)、磷酸化smad 2/3及膠原蛋白水準。藉由壓力誘導之動脈擴張量測血管平滑肌功能。在育種成內皮特異性Tie2-Cre小鼠之Rosa-tdT小鼠中進行細胞譜系追蹤。含有Rosa-tdT之小鼠在含有Cre重組酶之細胞中表現番茄紅。mActRIIA-Fc係指活化素A配位體捕捉劑(參見例如美國專利第8,173,601號及Carrancio等人, 2014, British Journal of Haematology, 165:870-882)。

2.5.3結果

CKD增加循環Dkk1及活化素水準。在患病腎臟中，活化素在肌纖維母細胞中表現，且經由磷酸化smad 3之ActRIIA信號傳導增加。在患病腎臟中，mActRIIA-Fc (ActRIIA配位體捕捉劑)抑制腎psmad 3、Col1A1表現、尿蛋白水準及Dkk1水準且增加克羅索水準。在血管中，ActRIIA水準及信號傳導藉由CKD連同降低之血管平滑肌分化及功能而減弱。在CKD小鼠血管中，mActRIIA-Fc增加血管平滑肌細胞分化且抑制骨母細胞轉化及血管鈣化。在循環中，mActRIIA-Fc降低Dkk1水準。相對於具有正常腎功能之Tek-Cre/Rosa-tdT小鼠，CKD誘導番茄紅在Tek-Cre/Rosa-tdT CKD小鼠之受傷股動脈之外膜細胞中之表現，其中番茄紅限於股動脈內皮，展現在血管損傷期間CKD誘導Tie2陽性細胞。

2.5.4結論

CKD降低血管平滑肌功能且刺激骨母細胞轉化及血管鈣化。 用mActRIIA-Fc降低CKD中升高活化素之影響抑制Smad依賴性腎纖維化，阻斷主動脈骨母細胞轉化，增加血管平滑肌分化，且減少血管鈣化。

實例6：活化素信號傳導在CKD-MBD之腎性骨營養不良之發病機制中之作用

2.6.1.1介紹

慢性腎病-礦物質/骨骼病症(CKD-MBD)包括血管鈣化及骨營養不良。CKD增加循環活化素(TGFβ超家族之配位體)及活化素信號傳導(圖21A)。用活化素IIA型受體(ActRIIA)配位體捕捉劑(mActRIIA-Fc)抑制ActRIIA信號傳導抑制血管鈣化及預防心臟肥大。此實例展現活化素信號傳導在腎性骨營養不良之發病機制中之作用。

2.6.1.2方法

假操作ldlr-/-高脂肪餵養小鼠(假處理組；n=12)顯現糖尿病及高膽固醇血症。有高磷酸鹽血症、升高之FGF-23及腎小球濾過率之60%降低之CKD (CKD-3)藉由5/6腎切除在ldlr-/-高脂肪餵養小鼠中在14週齡時誘導，且為動脈粥樣硬化血管鈣化之模型。CKD-3小鼠用mActRIIA-Fc 10 mg/kg (mActRIIA-Fc；n=15)或媒劑(VEH；n=13)處理，在22週齡時開始每週腹膜內注射且在28週藉由骨骼組織形態測定術及微電腦斷層攝影術研究。將CKD-3之結果與野生型(WT；n=5)小鼠及假處理組相比。

2.6.2結果

相對於WT (鬆質骨體積/組織體積(BV/TV)：12.90%)，假處理組小鼠展現與衰弱性骨骼疾病相關之降低之BV/TV (10.92%)。CKD-3之誘導在VEH小鼠中引起高轉換骨病，及較低BV/TV (11.22%)；此藉由

6週mActRIIA-Fc處理反轉(13.28%)。CKD-3之誘導引起小樑厚度減小，其藉由6週mActRIIA-Fc處理反轉。CKD-3 VEH處理小鼠展現與假處理組(1.05%及33.40/100 mm)相比，較高之侵蝕表面/骨骼表面及較高破骨細胞數/100 mm骨骼長度(分別為1.83%及62.32/100 mm)，其藉由mActRIIA-Fc降低(1.23%及38.37/100 mm)。當與WT或假處理組相比時，CKD-3 VEH處理小鼠亦引起展現之較高骨母細胞表面/骨骼表面及較高骨母細胞數/100 mm骨骼長度(分別為1.58%及110.63/100 mm；P<0.05) (分別圖21B及圖21C)。與VEH相比，mActRIIA-Fc顯著降低骨母細胞表面/骨骼表面及骨母細胞數/100 mm骨骼長度(0.68%及43.18/100 mm；P<0.05)。儘管骨母細胞數相對於VEH顯著減少，維持用mActRIIA-Fc處理之礦物質接合速率(分別0.42及0.40 μm^3/天)，伴隨顯著較高骨骼形成速率/骨母細胞(分別0.17相對於0.48 μm^3/100個細胞/年；相對於VEH，P<0.05)，其類似於WT (0.42 μm^3/100個細胞/年) (圖21D)。

表13.組織形態學結果(平均值+ SEM)

	假處理組	CKD-3 + 媒劑	CKD-3 + mActRIIA-Fc
BV，%	10.9±1.3	11.2±0.8	13.3±1.2
小樑厚度(板)，μm	30.9±2.1	31.8±1.7	33.2±1.9
小樑分離(板)μm	269.4±17.3	261.9±16.6	238.1±24.9
類骨質體積/BV，%	0.3±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1
類骨質表面/骨骼表面，%	2.5±0.6	2.9±0.7	1.7±0.4
類骨質厚度，μm	2.1±0.4	1.9±0.3	1.9±0.2
侵蝕表面/骨骼表面，%	1.1±0.2	1.8±0.5	1.2±0.5
破骨細胞數/骨骼周長，#/100 mm	33.4±5.1	62.3±19.5	38.4±15.4
破骨細胞表面/骨骼表面，%	1.0±0.2	1.7±0.5	1.1±0.5
礦物質接合速率/天，微米/天	0.4±0.0	0.4±0.1	0.4±0.0
雙標籤/骨骼表面，%	3.0±0.9	3.7±1.0	1.6±0.3
單標籤/骨骼表面，%	8.0±0.9	10.1±1.1	10.3±1.9
礦化表面/骨骼表面，%	7.0±0.9	8.8±1.1	6.8±1.1
骨骼形成速率/骨骼表面，立方毫米/平方公分/年	10.8±2.3	13.9±2.5	9.5±1.2
礦化延遲時間，天	1.9±0.4	1.9±0.5	1.3±0.3
類骨質成熟時間，天	6.3±1.4	5.4±0.9	4.9±0.5

SEM=平均標準誤差

mActRIIA-Fc不影響高磷酸鹽血症及FGF-23水準。

2.6.3結論

增加之循環活化素促成與CKD-3相關之高轉換骨營養不良。 用mActRIIA-Fc (ActRIIA配位體捕捉劑)之活化素信號傳導抑制在CKD-3中藉由抑制骨骼再吸收及標準化礦物質接合速率及骨骼形成速率/骨母細胞，抵消CKD之負面影響來增加骨體積。

2.7實例7：用遞增劑量水準之hACTRIIA-Fc處理之血液透析個體中骨質量及腹部主動脈血管鈣化之定量電腦斷層攝影術結果

2.7.1介紹

高轉換腎性骨營養不良表現為降低之皮層及增加之小樑骨質質量，引起增加之骨折風險。基於活體外資料，活化素II型受體-IgG1融合蛋白hActRIIA-Fc阻斷活化素A信號傳導且可減少破骨細胞生成且促進骨骼中之骨母細胞成熟。在進行血液透析(HD)之個體中之目前分析使用定量電腦斷層攝影術(QCT)評估hActRIIA-Fc對骨礦物質密度(BMD)及腹部主動脈血管鈣化之影響。

2.7.2方法

在針對貧血之校正在進行HD之個體中之hActRIIA-Fc研究中，將對紅血球生成素刺激劑(ESA)反應之個體清除其ESA影響直至血色素(Hb) <10 g/dL，隨後隨機化成持續高達8個劑量週期每28天皮下投與之hActRIIA-Fc 0.3 mg/kg (n=9)、0.5 mg/kg (n=8)、0.7 mg/kg (n=9；7名已完成，2名進行中)或安慰劑(PBO；n=9)。利用14天劑量週期之劑量組目前參加。關於對Hb之影響、安全性參數、BMD、血管鈣化及骨骼轉換之生物標記評估個體。治療失敗(Hb <9 g/dL)用ESA/輸注救援。在基線及在225天治療期之後獲得髖、腰椎及腹部主動脈之QCT掃描。

2.7.3結果

在於研究中隨機化之35名個體中，20名進行配對QCT評估(PBO：n=3；0.3 mg/kg：n=6；0.5 mg/kg：n=5；及0.7 mg/kg：n=6)。一些進行配對QCT之個體由於治療失敗而有限暴露於hActRIIA-Fc。表14展示PBO及各hActRIIA-Fc劑量組之BMD及血管鈣化結果。與PBO相比，hActRIIA-Fc似乎緩和高轉換腎性骨營養不良對皮層及小樑BMD之影響且減緩血管鈣化之進程。

表14

			hActRIIA-Fc					
	PBO	**n**	**0.3 mg/kg**	**n**	**0.5 mg/kg**	**n**	**0.7 mg/kg**	**n**
服用研究藥物之天數	107.3	3	107.2	6	152.6	5	151.8	6
股骨頸皮層BMD，平均CFB%	-0.91%	3	-1.38	5	1.56%	5	0.90%	4
具有股骨頸皮層BMD之>2%增加之個體%	0.00%	3	20.00%	5	40.00%	5	75.00%	4
腰BMD（小樑），平均CFB%	12.59%	3	7.95%	6	0.54%	5	1.93%	6
總蓋斯頓記分，平均CFB%	58.42%	3	24.89%	6	17.26%	5	7.42%	5
具有蓋斯頓記分之<15%增加之個體，%	33.33%	3	83.33%	6	80.00%	5	100.00%	5
體積記分之平方根(mm^3)，平均CFB	4.54	3	11.07	6	1.23	5	1.26	5

CFB=相對於基線之變化。

2.7.4結論

此等資料展現hActRIIA-Fc以劑量依賴性方式反轉高轉換腎性骨營養不良對皮層及小樑骨之影響，且減緩血管鈣化之進程。

2.8實例8.用遞增劑量水準之ACTRIIA-HFC (SEQ ID NO:7；「索塔特賽普特」)治療之血液透析個體中骨質量及腹部主動脈血管鈣化之定量電腦斷層攝影術結果：

2.8.1介紹

參見實例7 (章節2.7)之介紹(章節2.7.1)及方法(章節2.7.2)。此實例呈現來自在實例7 (章節2.7)中進行之研究，在研究之稍後日期獲得之額外資料。

2.8.2結果

總共35名個體隨機化且接受至少一種劑量之安慰劑或ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7；「索塔特賽普特」，如表15中所指示。

表15.隨機化個體及QCT分析子集

個體	安慰劑	索塔特賽普特 0.3 mg/kg	索塔特賽普特 0.5 mg/kg	索塔特賽普特 0.7 mg/kg
隨機化且接受≥ 1種劑量之安慰劑或索塔特賽普特	9	9	8	9
在基線及第225天之QCT量測值	4	6	5	6

個體安置描述於圖22A中，包括在基線及第225天進行配對QCT量測之個體。大多數停止研究治療之個體具有需要救援之治療失敗，一般因為血色素濃度低於9 g/dL。大多數停止研究治療之個體接受安慰劑或0.3 mg/kg之索塔特賽普特。個體中無一者由於不良事件而停止治療。此外，在進行配對QCT量測之21名個體中，12名由於在治療期期間之血色素治療失敗需要救援療法，其中之9名在前3個劑量週期內需要救援。

在進行配對QCT量測之個體中，基線人口統計及臨床特徵一般在治療組之間類似(表16)。然而，在亦為最年輕組之安慰劑組中存在實質上較長透析時間。在基線生物標記及蓋斯頓記分方面組之間亦存在差異(表17)。

表16.進行配對QCT量測之個體之基線人口統計及臨床特徵

	安慰劑 (n=4)	索塔特賽普特 0.3 mg/kg (n=6)	索塔特賽普特 0.5 mg/kg (n=5)	索塔特賽普特 0.7 mg/kg (n=6)
年齡，平均值，歲	51.3	57.3	60.8	63.0
女性，n (%)	1 (25.0)	6 (66.7)	0 (0.0)	4 (66.7)
人種，n (%)				
白人	1 (25.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	5 (83.3)
黑人	2 (50.0)	3 (50.0)	2 (40.0)	1 (16.7)
亞洲人	1 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
種族，n (%)				

	安慰劑 (n=4)	索塔特賽普特 0.3 mg/kg (n=6)	索塔特賽普特 0.5 mg/kg (n=5)	索塔特賽普特 0.7 mg/kg (n=6)
美籍西班牙人	0 (0.0)	2 (33.3)	3 (60.0)	2 (33.3)
非美籍西班牙人	4 (100.0)	4 (66.7)	2 (40.0)	4 (66.7)
透析後體重，平均值，kg	65.5	80.3	79.4	84.5
身體質量指數，平均值，kg/m^2	24.2	27.7	26.9	29.9
糖尿病，n (%)	2 (50.0)	5 (83.3)	5 (100.0)	5 (83.3)
副甲狀腺切除術，n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
透析時間，平均值，月	165.8	43.3	22.4	68.1
非鈣磷酸鹽結合劑，n (%)*	4 (100.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	3 (50.0)
基於鈣之磷酸鹽結合劑，n (%)*	1 (25.0)	4 (66.7)	4 (80.0)	4 (66.7)
擬鈣劑，n (%)*	1 (25.0)	2 (33.3)	0 (0.0)	2 (33.3)
1,25-OH維生素D類似物，n (%)	3 (75.0)	5 (83.3)	2 (40.0)	4 (66.7)

*個體可接受多種類型之結合劑

表17.進行配對QCT量測之個體之平均基線生物標記、體積BMD及蓋斯頓記分

	安慰劑 (n=4)	索塔特賽普特 0.3 mg/kg (n=6)	索塔特賽普特 0.5 mg/kg (n=5)	索塔特賽普特 0.7 mg/kg (n=6)
基線全PTH，pg/mL	209.2	104.8	135.5	100.4
BSAP[a]，μg/L	24.0	18.0	13.2	15.5
P1NP[b]，ng/mL	548.3	376.2	468.4	437.5
CTX[c]，pg/mL	3,152.3	2,062.5	2,266.8	2,246.5
總髖整體BMD，mg/cm^3	276.8	286.6	280.0	281.0
股骨頸皮層BMD，mg/cm^3	640.5	667.0	593.1	594.8
平均脊椎(L1,L2)BMD，mg/cm^3	140.1	125.6	149.1	118.7
VC總蓋斯頓記分[d]	6,498.8	9,472.7	3,618.5	1,862.1

註釋：n反映進行配對QCT評估之隨機化個體之數目；可用於各參數之個體之實際數目可變化。PTH=副甲狀腺激素。

[a] 骨骼=特異性鹼性磷酸酶(BSAP)參考範圍：男性，6-30；女性(停經前)，3-19；女性(停經後)，6-26。

[b] 原膠原1型N-前肽(P1NP)參考範圍：男性，30-110；女性20-108

[c] C端肽(CTX)參考範圍：男性，0-854；女性(停經前)，26-573；女性(停經後)，104-1,008

[d] 較低蓋斯頓記分指示較低血管鈣化水準。

嚴重不良事件一般認為與索塔特賽普特不相關，不引起停止，且用繼續療法解決。在索塔特賽普特治療組中未報導死亡。不良事件在嚴重性方面大多為輕度或中度，與研究藥物不相關，在治療組之間相對類似，且一般符合個體之病史。在前28天劑量週期中及在225天

治療期期間，家庭血壓量測顯示在治療組中之任一者中在個體中相對於基線之不一致或劑量依賴性變化。

在腹部主動脈總蓋斯頓記分中相對於基線之變化提供於表18中。具有腹部主動脈總蓋斯頓記分之<15%進展之個體的比例顯示於圖22B中。

表18.基線及腹部主動脈總蓋斯頓記分及平方根轉換之總體積記分中相對於基線之變化*

	安慰劑 (n=4)	索塔特賽普特 0.3 mg/kg (n=6)	索塔特賽普特 0.5 mg/kg (n=5)	索塔特賽普特 0.7 mg/kg (n=6)
腹部主動脈總蓋斯頓記分				
基線總蓋斯頓記分	6,498.8	9,472.7	3,618.5	1,862.1
相對於基線總蓋斯頓記分之變化	787.8	8.578.9	225.7	171.0
相對於基線總蓋斯頓記分之變化%	58.4	29.9	17.3	7.4
平方根轉換之總體積記分				
基線總體積平方根，mm^3	39.0	46.2	33.1	27.4
相對於基線總體積平方根之變化，mm^3	3.4	11.1	1.2	1.3

註釋：n反映進行配對QCT評估之隨機化個體之數目；可用於各參數之個體的實際數目可變化。

*較低總蓋斯頓及平方根轉換之總體積記分指示血管鈣化之較低水準。

此外，表19提供股骨頸皮層及平均腰椎小樑體積BMD量測中相對於基線之變化百分比。分析具有股骨頸皮層BMD之>2%增加之個體的比例且確定用索塔特賽普特治療與具有股骨頸皮層骨之≥2%增加之個體的比例增加相關(參見表19及圖22C)。亦參見Malluche等人, 2014, Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 9:1254-1262。此外，在高轉換ROD中，小樑骨質量增加，如藉由腰椎小樑BMD所量測，與一般群體相比無ESKD中之椎骨骨折率降低(參見Leonard MB, 2009, Semin. Nephrol., 29:133-143,及Duan等人, 1999, J. Clin. Endocrinol. Metab. 84:718-722)。在此設置中，增加之小樑骨質量品質不佳(參見Malluche等人,

2012, J. Am. Soc. Nephrol. 23:525-532)。用索塔特賽普特治療減緩腰椎中小樑骨質量增加(表19)。

表19. 基線及股骨頸皮層及平均腰椎(L1、L2)小樑BMD中相對基線之變化百分比

	安慰劑 (n=4)	**索塔特賽普特 0.3 mg/kg (n=6)**	**索塔特賽普特 0.5 mg/kg (n=5)**	**索塔特賽普特 0.7 mg/kg (n=6)**
股骨頸皮層				
基線BMD，mg/cm^3	640.5	667.0	593.1	594.8
相對於基線BMD之變化%(n)	-1.4 (4)	-1.4 (5)	1.6 (5)	-0.1 (4)
平均腰椎(L1、L2)小樑				
基線BMD，mg/cm^3	140.1	125.6	149.1	118.7
相對於基線BMD之變化%(n)	10.9 (4)	8.0 (6)	0.5 (5)	4.5 (6)

註釋：n反映進行配對QCT評估之隨機化個體之數目；可用於各參數之個體的實際數目可變化。

2.8.3結論

基於基線生物標記資料，此實例中之個體傾向於具有高轉換ROD。安慰劑組具有降低之皮層骨質量，增加之小樑骨質量及在ESKD中在類似於其他較大研究之速率下出現的增加之血管鈣化(Raggi等人, 2011, Nephrol. Dial. Transplant. 26:1327-1339)，正如針對高轉換ROD所預期。

在基線及第225天(其在高達八個28天劑量週期之後)量測之QCT資料指示用索塔特賽普特治療高轉換ROD產生對CKD-MBD之多種參數之影響，包括減緩之血管鈣化進展、增加之股骨頸皮層骨質量及減緩之腰椎骨質量增加。血管鈣化之減少及骨質量之增加符合在血管鈣化之*ldlr-/-*高脂肪餵養，5/6腎切除小鼠模型中之組織學發現(Fang等人, 2014, Abstract, ASN Kidney Week 2014, November 11-16, 2014, Philadelphia, PA)。

2.9實例9：ACTRIIA-HFC (SEQ ID NO:7，「索塔特賽普特」)影響末

期腎病之多種表現

2.9.1背景

此實例呈現來自臨床研究之資料。實例7及8 (章節2.7及章節2.8)亦呈現來自此研究之資料。

此進行中之隨機化、單盲、安慰劑對照研究使用定量電腦斷層攝影術評估ActRIIA-hFc (SEQ ID NO:7；「索塔特賽普特」)，用於在血液透析個體中校正貧血之ActRIIA-IgG1融合蛋白配位體捕捉劑之藥物動力學、安全性及血色素影響，且探索其對血管鈣化及骨礦物質密度之影響。此實例提供0.3、0.5及0.7 mg/kg劑量組之臨時結果。

2.9.2方法

將對紅血球生成素刺激劑(ESA)反應之個體清除ESA影響直至血色素<10 g/dL且隨機化成持續≤8個劑量週期每28天皮下投與之安慰劑或索塔特賽普特。用ESA或輸注救援治療失敗(血色素<9 g/dL)；不准許個體內劑量遞增。在基線及在225天治療期之後獲得髖、腰椎及腹部主動脈之定量電腦斷層攝影掃描。報導的為藥物動力學、安全性、家庭血壓、血色素、血管鈣化及骨礦物質密度影響之臨時結果。

2.9.3結果

在用安慰劑(n=9)或索塔特賽普特0.3 mg/kg (n=9)、0.5 mg/kg (n=8)及0.7 mg/kg (n=9)處理之個體中，不良事件大多為輕度/中度，與研究藥物不相關，在組之間在類型/嚴重性方面相對類似，且一般符合個體病史。在安慰劑組中出現兩例死亡。在家庭血壓中不存在劑量依賴性變化。在225天治療期中，在分別用安慰劑或索塔特賽普特0.3、0.5或0.7 mg/kg治療之33%、33%、63%及78%個體中血色素>10 g/dL。在分別用安慰劑或索塔特賽普特0.3、0.5或0.7 mg/kg治療之4、6、5及6名個體中獲得之配對定量電腦斷層攝影分別顯示33%、80%、80%及100%中之血管鈣化之<15%進展，及0%、20%、40%及75%中之

股骨頸皮層骨礦物質密度之>2%增加。

2.9.4結論

索塔特賽普特以可接受之安全概況在血液透析中耐受，而無家庭血壓增加。在血色素、血管鈣化及骨礦物質密度中存在對索塔特賽普特之劑量依賴性反應。

2.10實例10：CKD中失調ACTRIIA信號傳導促成動脈粥樣硬化鈣化及腎纖維化

此實例係關於在本文所描述之其他實例(包括實例4)中描述及進行之實驗。

2.10.1方法

2.10.1.1產生動物模型

動脈粥樣硬化*低密度脂蛋白受體*缺乏型*(ldlr-/-)*雄性(C57Bl/6J背景)購自Jackson Laboratories且在12週齡開始喂入高脂肪飲食(42%來自脂肪之熱量)。小鼠肥胖，在22週齡耐胰島素，在28週齡有糖尿病及有高膽固醇血症。

如先前所述利用兩步程序產生慢性腎病。(Davies MR,等人J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1559-1567；Davies MR,等人 J Am Soc Nephrol 2005; 16: 917-928)。在出生後12週經由2 cm側腹切口將電灼法施加至右側腎臟，接著為在14週齡進行左側腎全切除術。改變灼燒術之強度以產生藉由在20週齡之菊糖清除率確認的中度(CKD-3)腎損傷(圖33A、B)。對照動物接受假操作，其中將合適腎臟暴露且移動但不以任何其他方式處理。在此研究中使用五組小鼠(圖23B)。第一組為喂入常規飲食之野生型C57Bl/6J小鼠(WT)。此為用於規範對照值之正常腎功能及飲食組。第二組為喂入高脂肪飲食且假操作之*ldlr-/-*小鼠(假處理組)。此組充當對照組以確定腎病之影響。第三組為喂入高脂肪飲食，GFR等於人類CKD 3期降低之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3)，在22週安樂

死，圖25A、B、C中使用之基線血管鈣化組(CKD-3)。第四組為患有CKD-3，接受在22週開始之媒劑(磷酸鹽緩衝鹽水)一週兩次之皮下注射直至在28週安樂死之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3 V)。第五組為患有CKD-3，接受在22週開始之mActRIIA-Fc (Celgene, Summit, NJ)，10 mg/kg一週兩次之皮下注射直至在28週安樂死之*ldlr-/-*小鼠(CKD-3 R)。使用之劑量先前於PK/PD研究中顯示為用於刺激骨骼形成之有效劑量。

使用之CKD之第二模型為X相關奧爾波特氏症候群之鼠同源物，該症候群為在基因中缺乏IV型膠原蛋白之α5鏈COL4A5。(Rheault MN,等人, J. the Am. Soc. Neph. 2004; 15: 1466-1474)。此為自發性腎病之模型，且在整個結果中使用以確認腎切除誘導之CKD之影響。育種對購自Jackson Laboratories且經育種用於實驗。在出生之後150天時半合子雄性自發地罹患與人類CKD 3-4期類似之腎病且在生命之第75天罹患血尿症。

在所有情況下，在麻醉下進行安樂死。腹膜內麻醉(甲苯噻嗪13 mg/kg及氯胺酮87 mg/kg)用於所有程序。在第二次手術之後1週獲取隱靜脈血液樣品以評估基線手術後腎功能。在處死時，藉由心內穿刺獲取血液，且整塊剝離心臟及主動脈。

2.10.1.2菊糖清除

若安樂死在28週，則在20週或26週根據製造商說明(BioPal Inc., Worcester, MA)進行菊糖清除。

2.10.1.3化學鈣化定量

主動脈在處死時剝離，且所有額外組織藉由在剝離顯微鏡下鈍器剝離移除。組織在60℃下乾燥20-24小時，稱重且用研杵及研缽碾碎成粉末。鈣在4℃下溶離在1N HCL中持續24小時。使用甲酚酞胺羧錯合劑方法(Sigma, St Louis, MO)，根據製造商之說明分析溶離液之鈣含量，且結果針對乾組織重量校正。

2.10.1.4血液測試

在血液抽取之日藉由經由動物設施進行之標準自動分析儀實驗室方法分析血清之血液脲氮(BUN)、鈣及磷酸鹽。在ELISA分析中測定血漿活化素(Fitzgerald Industries, Acton, MA)、卵泡抑素(MYBIOSOURCE Inc., San Diego, CA)及卵泡抑素-樣3(MYBIOSOURCE Inc.)水準。用ELISA (R&D Systems, Minn., MN)分析血清Dkk1水準。對於ELISA分析，藉由隱靜脈或心臟穿刺在安樂死時抽取血液。在收集時所有血液樣品放在冰上。藉由在6000 rpm下5分鐘及14000 rpm下2分鐘，皆在4℃下之2步離心製造血小板貧血EDTA血漿樣品。樣品冷凍儲存在-20℃或-20℃以下直至使用。

2.10.1.5組織學及免疫組織化學

主動脈及腎臟組織固定在10%中性緩衝福馬林中隔夜，隨後在4℃下轉移至70%乙醇中，嵌入石蠟中且製備5微米切片。將載玻片在二甲苯中去石蠟且在分級乙醇系列中脫水且隨後復水。根據標準方案，使用馬森三色染色法染色偵測腎臟及心臟纖維化且使用茜素紅染色偵測鈣化。(Gregory CA,等人 Analytical Biochem. 2004; 329: 77-84)。為了免疫染色，將載玻片在20%正常山羊血清中阻斷20 min且用初級抗體在4℃下培育隔夜。將載玻片在PBS中洗滌且在20%正常山羊血清中阻斷20分鐘，隨後用山羊抗兔Alexa 488二級抗體1:400 (Life Technologies，A11008)在室溫下持續30 min，或使用用於根據製造說明信號放大之TSA套組(Life Technologies，T 20932)培育。對於雙重免疫螢光染色，將切片阻斷在20%山羊血清中且依序用第一初級及二級抗體及第二初級及二級抗體，使用山羊抗兔Alexa 488及Alexa 568二級抗體1:400 (Life Technologies，A11008及A11011)或用於根據製造說明信號放大之TSA套組(Life Technologies，T20932及T20934)染色。當來自相同物種之初級抗體用於雙重染色時，載玻片在第二染色

之前在微波中在檸檬酸鹽緩衝液中加熱5 min (Tóth ZE, J. HistoChem. & CytoChem. 2007; 55: 545-554)。初級抗體在此研究中用於免疫染色：兔多株抗ActRIIA抗體1:250 (Abcam，ab 135634)、兔多株抗抑制素βA抗體1:100 (Santa Cruz，sc-50288)、兔多株抗CD31抗體1:50 (Abcam，ab28364)及兔多株抗β-索烴素抗體1:500 (Abcam，ab32572)。

2.10.1.6 RT-PCR

使用RNeasy Mini套組(Qiagen, Valencia, CA)自主動脈及腎臟提取RNA。使用來自Bio-Rad (Hercules, Ca)之iScript cDNA合成套組，根據製造商之說明，在Veriti熱循環儀(Applied Biosystems)上將1 μg總RNA經DNA酶處理且反轉錄。引子使用Vector NTI (Invitrogen, Grand Island, NY)或Primer Express (Life Technologies, Grand Island, NY)軟體設計。在反轉錄之後，使用StepOne Plus即時PCR儀器(Applied Biosystems)、來自Sigma (St. Louis)之SYBR Green及來自Invitrogen之PCR套組進行即時。各反應一式三份地在95℃，45秒及60℃，30秒下及60秒在72℃下進行持續40次循環。此接著為熔融循環，其由溫度自60℃至95℃逐步增加組成。在各基因之解離曲線中觀測到單個主峰，證實PCR產物之特異性。將Ct數(臨限值)設定在PCR之指數期內且用於計算相關基因之表現水準。B2m用作內標且使值標準化。由c_T對log cDNA稀釋度(對應於log複本數)組成之標準曲線藉由擴增對應於未知量之擴增子之cDNA之連續稀釋度產生。陰性對照藉由如下進行：藉由在RT-PCR之前沸騰5 min以確保基因組DNA不擴增來使反轉錄酶失活。

2.10.1.7免疫墨點法(西方分析)

自小鼠之腎臟及主動脈藉由含有蛋白酶抑制劑混合液(Santa Cruz)之RIPA溶解緩衝液(Thermo Scientific)製備全細胞溶解蛋白。將

溶解物(20 μg)負載在8-12% SDS-PAGE凝膠中且用針對以下各者之抗體進行免疫墨點法：抑制素β-A (Santa Cruz)、α-微管蛋白(Santa Cruz)、肌動蛋白-α平滑肌(Sigma)、Runx2 (Cell Signaling)、Myocd (Santa Cruz)、ACVRL1 (Origene)、ACVR1 (Cell Signaling)、Erk1/2 (Cell Signaling)、磷酸化-Erk1/2 (Cell Signaling)、ACVR1B (Origene)、Col1a1 (Santa Cruz)、Smad2/3 (Cell Signaling)或磷酸化-Smad2/3 (Cell Signaling)。免疫沈澱(IP)分析使用相同全細胞溶解蛋白。為了減少非特異性結合，使用預洗滌蛋白質A瓊脂糖珠粒(Cell Signaling)將樣品預清潔。經預清潔之樣品用磷酸-絲胺酸抗體(Abcam)培育隔夜。隨後在蛋白質A瓊脂糖珠粒上捕獲IP-抗體複合物且藉由免疫墨點法分析來偵測蛋白質。

使用ANOVA進行統計分析。所有資料表示為平均值± SD，除非在圖例中另外說明。組之間的差異使用Fisher LSD方法在此之後評估且認為在$p < 0.05$下顯著。所有組之資料表示7-15之「n」。對於即時PCR分析，在各實驗組中使用最少3個樣品。關於圖26C中之血管鈣化資料，方框表示中位數及四分位數範圍(自第25個百分位至第75個百分位)，且誤差杠顯示在第25個百分位以下及第75個百分位以上之四分位數範圍之1.5倍。使用用於多重比較之ANOVA Holm-Sidak方法比較中位數，$p<0.05$，作為顯著差異之重要水準。

2.10.2結果

2.10.2.1實驗設計及CKD模型中之腎功能

高脂肪餵養*ldlr-/-*小鼠為需要飲食及基因型以產生動脈粥樣硬化血管鈣化之動脈粥樣硬化血管鈣化模型。(Davies MR, 等人J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1559-1567；Towler DA, 等人 J. Biological Chem. 1998; 273: 30427-30434)。腎功能類似於人類3期CKD (CKD-3)在*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠中藉由腎皮層損傷及對側腎切除降低(圖33A、B)。

CKD-3小鼠為高血磷的(表**20**)，符合人類3b-4期CKD中高磷酸鹽血症之發作。(Isakova T,等人Kidney Int 2011; 79: 1370-1378)。

表**20**：測試之動物中之血清生物化學參數

參數	第1組 野生型	第2組 假處理組	第3組 **CKD-3 V**	第4組 **CKD-3 R**
小鼠品系	C57/BJ6	Idlr-/-	Idlr-/-	Idlr-/-
飲食	普通食物	高脂肪	高脂肪	高脂肪
手術	無	假處理	CKD	CKD
出生後之週數	28	28	28	28
處理	無	無	媒劑	mActRIIA-Fc
N	12	15	14	15
BUN (mg/dl)	24.0 ± 4.6	20.6 ± 3.7	37.7 ± 7.6*	36.5 ± 5.8*
Ca (mg/di)	8.3 ± 1.8	8.9 ± 0.9	9.4 ± 0.8	8.8 ± 0.3
磷(mg/di)	8.9 ± 0.2	7.9 ± 2.3	11.0 ± 1.6*	11.8 ± 1.2*

*：<0.05，第3組及第4組與第2組相比。

2.10.2.2 CKD中之IIA型活化素受體(ActRIIA)水準

針對TGFβ超家族II型受體分析來自患有CKD-3之高脂肪餵養*ldlr-/-*小鼠之主動脈，該等受體為一種由II型及I型(ALK)受體構成之超家族受體雜多聚體之配位體結合組分。活化素II型受體A (ActRIIA)在血管平滑肌細胞(VSMC)中表現(圖24A、B)。在*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠中產生之CKD-3誘導主動脈中之ActRIIA下調(圖24A)。不受任何特定理論束縛，此符合藉由在其他組織中報導之高循環配位體水準產生的ActRIIA之內化及降解。(Simone ND, 等人 Endocrinology 1998; 139: 1147-1155；Liu ZH, 等人J. Endocrinology 2006; 189: 409-421)。內皮細胞ActRIIA未藉由免疫化學及免疫螢光偵測而偵測。(圖24B)。

2.10.2.3 CKD中ActRIIA配位體捕捉之血管影響

在來自用媒劑或ActRIIA配位體捕捉劑(mActRIIA-Fc)處理之CKD-3小鼠之主動脈勻漿中分析ActRIIA水準之CKD誘導抑制之影響(圖25A、B)。在*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠之主動脈中藉由Runx2及鹼性磷酸酶(Alpl)之mRNA表現評估CKD-3刺激之骨母細胞轉化。CKD-3刺激其表現且mActRIIA-Fc處理反轉CKD之影響(圖25A)。Runx2及Alpl

表現皆表示主動脈中骨母細胞轉化之生物標記，該等生物標記藉由mActRIIA-Fc處理反轉。平滑肌22α或轉凝蛋白(Tagln) (分化血管平滑肌細胞之生物標記) (Li L, Miano,等人 *Circulation Res.* 1996; **78**: 188-195)之主動脈mRNA藉由CKD-3降低且藉由mActRIIA-Fc刺激。CKD-3亦引起降低之主動脈心肌素(Myocd)mRNA表現(血管平滑肌細胞特異性轉錄因子)，但心肌素不受mActRIIA-Fc處理影響。關於CKD-3及mActRIIA-Fc處理對在圖25A中研究之各別mRNA之主動脈蛋白水準之影響，CKD增加主動脈Runx2及Alpl水準且mActRIIA-Fc使其標準化(圖25B，Alpl之資料未顯示)。CKD降低Tagln及α平滑肌肌動蛋白(αSMA) (分化血管平滑肌細胞之另一生物標記)之主動脈水準，且mActRIIA-Fc處理增加該等水準(圖25B，Tagln之資料未顯示)。心肌素水準未經CKD或mActRIIA-Fc處理改變。

*ldlr-/-*高脂肪餵養小鼠為動脈粥樣硬化、動脈粥樣硬化鈣化及2型糖尿病之模型，(Al-Aly Z,等人 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol. 2007; 27: 2589-2596；Towler DA,等人 J. Biological Chem. 1998; 273: 30427-30434)。經鑑定，尤其，CKD-3引起CKD-3媒劑處理小鼠(CKD-3 V)中主動脈粥樣化中之鈣沈積物之累積(圖26A)且增加總組織鈣水準(圖26B)。在用mActRIIA-Fc處理之CKD-3小鼠(CKD-3 mActRIIA-Fc)中不存在可見鈣沈積物。此外，mActRIIA-Fc將主動脈組織鈣含量降低至如在野生型及假處理小鼠中觀測之彼等水準的水準，及顯著低於CKD-3組中mActRIIA-Fc處理開始時存在之彼等水準的水準(圖26B)。

2.10.2.4主動脈中之ActRIIA信號傳導

藉由TGFβ超家族之典型信號轉導涉及配位體結合至II型受體，活化其絲胺酸/蘇胺酸激酶活性且刺激I型受體，Alk激酶之關聯及磷酸化(參見圖34中之圖解表示)。存在七種經TGFβ超家族利用之Alk激

酶，且Alk4 (ActRIB)為最常與ActRIIA信號傳導相關之I型受體(Abe Y MT,等人 Growth Factors (Chur, Switzerland) 2004; 22: 105-110)。ActRIIA水準在自CKD-3小鼠分離之主動脈勻漿中未降低，如在圖24中證明，且不與Alk4及Alk1之組織水準降低相關(圖27A)。Alk5及Alk2 (與ActRIIA信號傳導相關之其他1型受體)不可偵測。ActRIIA活性藉由量測受體異多聚化(例如調節Smad之磷酸化)之影響評估。CKD-3降低主動脈磷酸化smad 2/3水準(活化smad 2/3)，且與CKD-3V相比，mActRIIA-Fc增加該等水準(圖27A、B)。亦分析非典型ActRIIA信號傳導(圖34)：(1) map激酶(磷酸化-Erk1/2)藉由CKD降低且未進一步受mActRIIA-Fc影響(圖27A)，且(2) p38及JNK之血管平滑肌水準極低。此外，mActRIIA-Fc p-AKT水準保持不受影響，指示主動脈AKT/PI3激酶不受ActRIIA信號傳導影響。主動脈ActRIIA信號傳導(磷酸化smad 3)藉由CKD降低且藉由與動脈粥樣硬化主動脈中藉由ActRIIA配位體捕捉之骨母細胞轉化抑制相關的ActRIIA配位體捕捉刺激(圖25A、B、C)。

檢查另一非典型ActRIIA信號傳導路徑，Wnt路徑(圖34)。Wnt信號傳導似乎在主動脈內皮與VSMC之間不同地調節。主動脈β-索煙素(主要典型Wnt誘導之轉錄因子)藉由免疫螢光定位至內皮細胞，且在VSMC中不可偵測(圖28A、B)。在VSMC中分析Dkk1水準作為Wnt活性之生物標記。在CKD-3小鼠中CKD增加VSMC Dkk1水準且mActRIIA-Fc處理降低Dkk1水準(圖28D)。主動脈Dkk1水準藉由mActRIIA-Fc之降低指示血管平滑肌Wnt信號傳導藉由ActRIIA配位體捕捉抑制。此外，如下文所示之ActRIIA配位體捕捉降低腎Wnt活性之影響引起循環Dkk1水準之主要降低(圖28E)。全身性Dkk1之降低最可能影響內皮。此引起內皮中之Wnt信號傳導增加，其中β-索煙素如由主動脈Axin2水準之增加所示表現(圖28C)。Axin2為藉由β-索煙素

刺激且通常用於評估Wnt信號傳導之即刻早期基因。(Mao J, Wang J, Liu B, 等人 Mol. Cell 2001; 7: 801-809)。

2.10.2.5 ActRIIA配位體捕捉對α克羅索及腎ActRIIA信號傳導之影響

檢查腎α克羅索水準及CKD-3及mActRIIA-Fc處理之影響。如圖29A中所示，腎α克羅索水準之顯著增加藉由mActRIIA-Fc處理誘導。檢查腎ActRIIA水準及ActRIIA信號傳導。腎ActRIIA水準不受CKD-3影響(圖29B)。主要ActRIIA配位體，活化素A在CKD-3小鼠中強烈誘導且經mActRIIA-Fc處理遏制(圖31A-D)。可用磷酸化-Alk抗體之缺乏減弱I型受體活化之偵測，替代地需要磷酸絲胺酸抗體來免疫沈澱。沈澱之免疫墨點用抗Alk抗體進行。Alk4磷酸化未在CKD-3模型之患病腎臟中或藉由mActRIIA-Fc處理顯著改變(圖29B)。然而腎磷酸化smad 2/3藉由CKD-3增加且藉由mActRIIA-Fc降低，指示CKD中經由ActRIIA介導之腎Smad 2/3活化之組分包括與Alk4不同之Alk(圖29C)。

在腎纖維化上檢查ActRIIA配位體捕捉之影響。圖30A-D顯示當與CKD-3V處理小鼠(圖30A及圖30B)相比時，來自CKD-3 mActRIIA-Fc處理小鼠之三色染色法染色之腎臟皮質切片中之腎纖維化減少(圖30C及圖30D)。圖35A-D顯示低放大率冠狀腎臟切片，其中箭狀物鑑定圖30A-D中之高倍切片自何處獲取且箭頭描繪來自電灼法腎臟損傷之疤痕反應。mActRIIA-Fc降低疤痕反應，符合活化素在傷口癒合中之作用。此外，mActRIIA-Fc減少藉由CKD-3刺激之蛋白尿(圖30E)，符合藉由mActRIIA-Fc處理誘導之腎磷酸化smad 2/3及纖維化減少。

2.10.2.6 CKD中之可能之ActRIIA配位體

存在多種可能之ActRIIA配位體，包括活化素A及B、生長及分化因子11 (GDF11)、骨形態生成蛋白9及10 (BMP9及10)及對受體具有較低親和力之其他BMP (諸如BMP7)。但主要ActRIIA配位體為活化素。

使用兩種CKD模型，鑑定出全身性循環活化素A水準在*ldlr-/-*消融CKD模型中10倍升高且在Col4A5奧爾波特氏症候群小鼠模型中5倍升高(圖31A、B)。活化素B、GDF11及BMP9水準在此等模型中不受CKD影響。生理上，咸信在循環中存在少量游離活化素。不受任何特定理論束縛，此可歸因於化學計量上等於活化素水準之抑制劑水準。活化素與循環抑制因子卵泡抑素及卵泡抑素樣3 (fstL3)，(Welt C,等人 Experimental Biol. and Med. 2002; 227: 724-752)及抑制素相關，該等因子之循環水準(圖36A、B)及組織水準不經CKD-3影響或降低。循環中卵泡抑素、fstL3及抑制素(例如620 pg/ml之總數，加400 pg/ml未經量測之抑制素(Sharpe RM,等人 J. Andrology 1999; **20:** 94-101))相對於活化素A水準(>5000 pg/ml)之化學計量表明CKD產生顯著游離活化素水準，此為使得活化素A成為CKD中之活性循環因子之病理性事件。此資料指示腎病產生可下調血管ActRIIA之一或多種循環ActRIIA配位體。

針對活化素A (抑制素βA (Inhba)之均二聚體)自*ldlr-/-*動脈粥樣硬化鈣化模型分析腎臟組織以鑑定增加之循環活化素之來源。Inhba mRNA藉由CKD在腎臟中增加(圖31C)且活化素(抑制素β-A)蛋白水準增加(圖31D)。腎活化素表現定位在CKD-3小鼠之小管周圍肌纖維母細胞中(圖32A、B)。

2.10.3結論

此實例展現mActRIIA-Fc增加藉由磷酸化Smad2/3水準評估之主動脈ActRIIA信號傳導。此外，mActRIIA-Rc處理反轉CKD誘導之血管平滑肌反分化、骨母細胞轉化及新生血管內膜斑鈣化。在患病腎臟中，mActRIIA-Fc抑制而非刺激ActRIIA信號傳導且減少腎纖維化及蛋白尿。mActRIIA-Fc處理降低腎及循環Dkk1水準，展現Wnt活化在ActRIIA下游。此實例展現CKD中之失調ActRIIA信號傳導促成CKD-

MBD及腎纖維化，鑑定ActRIIA信號傳導為CKD中之治療標靶，且展現可在CKD之治療中利用活化素配位體捕捉劑(例如mActRIIA-Fc)。

3.序列描述

表21：序列資訊

SEQ ID NO:	描述	序列
1	人類ActRIIA前驅體多肽	MGAAAKLAFAVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNA NWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNIS GSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYF CCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPY YNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPP VLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGC VWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLP GMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKG SLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG LALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPV DEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVLR DYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGC VGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPK ESSL
2	人類ActRIIA可溶(細胞外)經處理多肽序列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPP
3	C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIA可溶(細胞外)經處理多肽序列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM
4	編碼人類ActRIIA前驅蛋白之核酸序列	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTC TTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTG GTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTA ATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAA ACTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGAT AAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAAT ATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGT TGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGG ACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGA AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTG TAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGA AGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACC TAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCC TTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTC ATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAG ATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCCAACTCAA GACCCAGGACCACCCCCACCTTCTCCATTACTA GGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCC CAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATA TTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAAT GAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAG CATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAA AAACGAGGCACCAGTGTTGATGTGGATCTTTGG CTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACTA TCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGG AATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCT AGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCT GGCCTAAAAGATGGCCACAAACCTGCCATATCT CACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTT GAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTT TGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTC TGCAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCG GAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTG CTATAAACTTCGAAAGGGATGCATTTTTGAGGA TAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGG AACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGAC CTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGG AAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGC AGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAAGAGGCCT GTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGA ATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGT TGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCA GAGACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACAT TGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGA CTTTCCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA
5	編碼人類ActRIIA可溶(細胞外)多肽之核酸序列	ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTT TTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACC AATCAAACTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGAC AAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGG AAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAA CAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTAT GACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAG CCCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAA TATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAG ATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTT ACACCTAAGCCACCC
6	包含融合至Fc結構域之ActRIIA之可溶細胞外結構域的融合蛋白	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDX1VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK X2VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNX3HYTQKSLSLSPGK* (其中X1為D或A；X2為K或A且X3為N或A)
7	融合至人類Fc結構域之人	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK

SEQ ID NO:	描述	序列
	類ActRIIA之細胞外結構域	DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
8	蜜蜂蜂毒肽(HBML)之前導序列	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
9	組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)之前導序列	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
10	天然ActRIIA前導序列	MGAAAKLAFAVFLISCSSGA
11	ActRIIA-hFc 及 mActRIIA-Fc N端序列	ILGRSETQE
12	ActRIIA之細胞外結構域之C端15個胺基酸刪除之ActRIIA-Fc蛋白	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTG GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	具有TPA前導序列之未經處理ActRIIA-hFc	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQE CLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFA TWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKD SPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPV TPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	編碼具有TPA前導序列之未經處理ActRIIA-hFc的核酸序列	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCC GGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAG GAGTGTCTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG ACAGAACCAATCAAACTGGTGTTGAACCGTGTT ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTG CTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAT AGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAA CTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAA AGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTT TCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAA TCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGG AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGAATTC
15	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端4個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-130)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP
16	人類ActRIIB前驅蛋白序列(A64)	MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV WKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF GLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKD HWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKES SI
17	人類ActRIIB可溶(細胞外)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE

SEQ ID NO:	描述	序列
	經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸19-134)	QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPPTAPT
18	C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸19-119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
19	編碼人類ActRIIB (A64)前驅蛋白之核酸序列	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTC TGGGGATCGCTGTGGCCCGGCTCTGGGCGTGGG GAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGA GCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGAC AAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAAC AGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGG CTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAG GCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCC AGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCT GCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTG GGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCG ACAGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTAC TCACTGCTGCCCATCGGGGGCCTTTCCCTCATC GTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGC AAGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAG GACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCCTCTGGTG GGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAA GGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGC CCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGAT CTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAA GCACGAGAACCTGCTACAGTTCATTGCTGCCGA GAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCC TCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACAT GGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTG CCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCT ATTGCCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTA TTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCT GACTTTGGCTTGGCTGTTCGATTTGAGCCAGGG AAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGG CACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGA GGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCTTCCT GCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCT GTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGA CGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGA GGAAGAGATTGGCCAGCACCCTTCGTTGGAGG AGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATG AGGCCCACCATTAAAGATCACTGGTTGAAACAC CCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCGAG

SEQ ID NO:	描述	序列
		GAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTG TCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTG ATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCGGAC TGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATG TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA
20	包含融合至Fc結構域之ActRIIB (A64；SEQ ID NO:17)之可溶細胞外結構域的融合蛋白	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
21	包含融合至Fc結構域，C端15個胺基酸刪除(SEQ ID NO:18)之ActRIIB (A64)之可溶細胞外結構域的融合蛋白	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端5個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-129)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPP
23	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-131)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPT
24	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-131)且具有L79D突變且具有TPA前導序列之未經處理	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

SEQ ID NO:	描述	序列
	ActRIIB-Fc融合蛋白	SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
25	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-131)且具有L79D突變之經處理ActRIIB-Fc融合蛋白	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPT
27	C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-119)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
28	人類ActRIIB前驅蛋白序列(R64)	MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV WKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF GLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKD HWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKES SI
29	人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸19-134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPPTAPT
30	C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸19-119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
31	人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD

SEQ ID NO:	描述	序列
	NO:28之胺基酸20-134)	RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPT
32	C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-119)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
33	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:16之胺基酸25-131)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPT
34	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:16之胺基酸25-131)且具有L79D突變且具有TPA前導序列之未經處理ActRIIB-Fc融合蛋白	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWAN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
35	EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:16之胺基酸25-131)且具有L79D突變之經處理ActRIIB-Fc融合蛋白	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
36	具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPT
37	具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPT
38	具有融合至具有GGG連接子之Fc結構域的L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV

SEQ ID NO:	描述	序列
	ID NO:28之胺基酸20-134)	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK*
39	具有融合至Fc結構域的L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK*
40	具有融合至Fc結構域的L79D突變且具有TPA前導序列之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-134)	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
41	具有融合至Fc結構域的L79D突變且具有TPA前導序列之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
42	具有變異C端序列(揭示於WO2007/053775中)之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCL EGPAHE
43	具有變異C端序列(揭示於WO2007/053775中)，具有L79D突變之人類ActRIIB	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCL

SEQ ID NO:	描述	序列
	可溶(細胞外)經處理多肽序列	EGPAHE
44	具有變異C端序列(揭示於WO2007/053775中)，具有融合至具有TGGG連接子之Fc結構域的L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCL EGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
45	編碼SEQ ID NO:24之核酸序列	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCC GGCGCCGCCGAAACCCGCGAATGTATTTATTAC AATGCTAATTGGGAACTCGAACGGACGAACCA ATCCGGGCTCGAACGGTGTGAGGGGGAACAGG ATAAACGCCTCCATTGCTATGCGTCGTGGAGGA ACTCCTCCGGGACGATTGAACTGGTCAAGAAAG GGTGCTGGGACGACGATTTCAATTGTTATGACC GCCAGGAATGTGTCGCGACCGAAGAGAATCCG CAGGTCTATTTCTGTTGTTGCGAGGGGAATTTCT GTAATGAACGGTTTACCCACCTCCCCGAAGCCG GCGGGCCCGAGGTGACCTATGAACCCCCGCCC ACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA TGA
46	包含融合至Fc結構域之ActRIIB (R64；SEQ ID	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY

SEQ ID NO:	描述	序列
	NO:29)之可溶細胞外結構域的融合蛋白	DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
47	包含融合至Fc結構域，C端15個胺基酸刪除之ActRIIB (R64) (SEQ ID NO:30)之可溶細胞外結構域的融合蛋白	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	Runx2 qRT-PCR引子1	CCGCACGACAACCGCACCAT
49	Runx2 qRT-PCR引子2	CGCTCCGGCCCACAAATCTC
50	Alp qRT-PCR引子1	ACGTGGCTAAGAATGTCATC
51	Alp qRT-PCR引子2	CTGGTAGGCGATGTCCTTA
52	奧斯特里克斯qRT-PCR引子1	TAGTGGTTTGGGGTTTGTTTACCGC
53	奧斯特里克斯qRT-PCR引子2	AACCAAATAACTCTTATTCCCTAAGT
54	克羅索qRT-PCR引子1	GCTCTCAAAGCCCACATACTG
55	克羅索qRT-PCR引子1	GCAGCATAACGATAGAGGCC
56	Sm22-α qRT-PCR引子1	GTTCCAGACTGTTGACCTCTTT
57	Sm22-α qRT-PCR引子2	CTGCGCTTTCTTCATAAACC
58	人類Runx2 mRNA	GTGTGAATGCTTCATTCGCCTCACAAACAACCA CAGAACCACAAGTGCGGTGCAAACTTTCTCCAG GAGGACAGCAAGAAGTCTCTGGTTTTTAAATGG TTAATCTCCGCAGGTCACTACCAGCCACCGAGA CCAACAGAGTCATTTAAGGCTGCAAGCAGTATT TACAACAGAGGGTACAAGTTCTATCTGAAAAA AAAAGGAGGGACTATGGCATCAAACAGCCTCT TCAGCACAGTGACACCATGTCAGCAAAACTTCT TTTGGGATCCGAGCACCAGCCGGCGCTTCAGCC CCCCCTCCAGCAGCCTGCAGCCCGGCAAAATGA GCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAACAG CAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCA GCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGG AGGCGGCGGCGGCGGCTGCGGCGGCGGCGGCG GCTGCGGCGGCGGCAGCTGCAGTGCCCCGGTTG CGGCCGCCCCACGACAACCGCACCATGGTGGA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GATCATCGCCGACCACCCGGCCGAACTCGTCCG CACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCGGTGCT GCCCTCGCACTGGCGCTGCAACAAGACCCTGCC CGTGGCCTTCAAGGTGGTAGCCCTCGGAGAGGT ACCAGATGGGACTGTGGTTACTGTCATGGCGGG TAACGATGAAAATTATTCTGCTGAGCTCCGGAA TGCCTCTGCTGTTATGAAAAACCAAGTAGCAAG GTTCAACGATCTGAGATTTGTGGGCCGGAGTGG ACGAGGCAAGAGTTTCACCTTGACCATAACCGT CTTCACAAATCCTCCCCAAGTAGCTACCTATCA CAGAGCAATTAAAGTTACAGTAGATGGACCTCG GGAACCCAGAAGGCACAGACAGAAGCTTGATG ACTCTAAACCTAGTTTGTTCTCTGACCGCCTCAG TGATTTAGGGCGCATTCCTCATCCCAGTATGAG AGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTC CCTGAACTCTGCACCAAGTCCTTTTAATCCACA AGGACAGAGTCAGATTACAGACCCCAGGCAGG CACAGTCTTCCCCGCCGTGGTCCTATGACCAGT CTTACCCCTCCTACCTGAGCCAGATGACGTCCC CGTCCATCCACTCTACCACCCCGCTGTCTTCCAC ACGGGGCACTGGGCTTCCTGCCATCACCGATGT GCCTAGGCGCATTTCAGATGATGACACTGCCAC CTCTGACTTCTGCCTCTGGCCTTCCACTCTCAGT AAGAAGAGCCAGGCAGGTGCTTCAGAACTGGG CCCTTTTTCAGACCCCAGGCAGTTCCCAAGCAT TTCATCCCTCACTGAGAGCCGCTTCTCCAACCC ACGAATGCACTATCCAGCCACCTTTACTTACAC CCCGCCAGTCACCTCAGGCATGTCCCTCGGTAT GTCCGCCACCACTCACTACCACACCTACCTGCC ACCACCCTACCCCGGCTCTTCCCAAAGCCAGAG TGGACCCTTCCAGACCAGCAGCACTCCATATCT CTACTATGGCACTTCGTCAGGATCCTATCAGTTT CCCATGGTGCCGGGGGGAGACCGGTCTCCTTCC AGAATGCTTCCGCCATGCACCACCACCTCGAAT GGCAGCACGCTATTAAATCCAAATTTGCCTAAC CAGAATGATGGTGTTGACGCTGATGGAAGCCAC AGCAGTTCCCCAACTGTTTTGAATTCTAGTGGC AGAATGGATGAATCTGTTTGGCGACCATATTGA AATTCCTCAGCAGTGGCCCAGTGGTATCTGGGG GCCACATCCCACACGTATCAATATATACATATA TAGAGAGAGTGCATATATATGTATATCGATTAG CTATCTACAAAGTGCCTATTTTTTAGAAGATTTT TCATTCACTCACTCAGTCATGATCTTGCAGCCAT AAGAGGGTAGATATTGAGAAGCAGAAGGCTCA AGAGAGACAATTGCAATCGAGCTTCAGATTGTT TACTATTTAAGATGTACTTTTACAAAGGAACAA AGAAGGGAAAAGGTATTTTTGTTTTTGTTGTTT GGTCTGTTATCATCAATAACCTGTTCATATGCC AATTCAGAGAGGTGGACTCCAGGTTCAGGAGG

SEQ ID NO:	描述	序列
		GAGAAGAGCAAAGCCGCTTCCTCTCTGTGCTTT GAAACTTCACACCCTCACGGTGGCAGCTGTGTA TGGACCAGTGCCCTCCGCAGACAGCTCACAAAA CCAGTTGAGGTGCACTAAAGGGACATGAGGTA GAATGGATGCTTCCATCACAGTACCATCATTCA GAATAACTCTTCCAATTTCTGCTTTCAGACATGC TGCAGGTCCTCATCTGAACTGTTGGGTTCGTTTT TTTTTTTTTTTTTCCTGCTCCAAGAAAGTGACTT CAAAAATAACTGATCAGGATAGATTATTTTATT TTACTTTTTAACACTCCTTCTCCCCTTTTCCCACT GAACCAAAAAGAAATCCCATCCCTAAAACCTG CCTTCTCCTTTTATGCAAAACTGAAAATGGCAA TACATTATTATAGCCATAATGGTATAGATAGTG ATTGCGTTTGGCTATGTGTTGTTTTCTTTTTTTT AAATTATGAATATGTGTAAAATCTGAGGTAACT TGCTAACGTGAATGGTCATATAACTTTAAAGAT ATATTTATAATTATTTAATGACATTTGGACCCTT GAAACATTTCTTAGTGTATTGATATGTTGACTTC GGTCTCTAAAAGTGCTCTTTATTAAATAACAAA TTTCTTCAGTGGTCTAGAGCCATATCTGAAATA TTGCTAAGCAATTTCAGTTCATCCAGGCACAAT GTGATTTTAAAAAATACTTCCATCTCCAAATAT TTTAGATATAGATTGTTTTTGTGATGTATGAAG GAAATGTTATGTTTAGTTCTTTCAGATCTTTGAA TGCCTCTAACACAGCTTTGCCTTCTAAAGCGGT AATTAGGGATTTAAAAAACAACCTTTAGCCCTT TATCAGCATGAAATGCTGGAGTGATGTGGTTTT CTAATTTCTTTGGGGTAATTATGACTCTTGTCAT ATTAAAAAGACAAGCACAAGTAAATCATTGAA CTACAGAAAAATGTTCTGTGGTTTCATAGTTAA GCAAAACTCTAAATCGCCAGGCTTCATAGCAAA GACATAGTCAGCTAAAAGCCGCACATGTGGAT AGAGGGTTCAATTATGAGACACCTAGTACAGG AGAGCAAAATTGCACCAGAGATTCTTAACCAAC CAGCCTTACCAAACAACACAACAGGGGAACCC CAATCTGCCTTACCCAAGGCCCCACTGGCAGCT TTCCACAGAATTTGCATTTAGAGGAGCAGAATG ACATCACTGTCCTTTGGGAGTAGGTCCTCTGAA AAGGCAGCAGGTTCCAGCAGGTAGCTGAGCTG AGAGGACATATGGCCCACGGGGACCTACAGAC AGCCTTTGACATTTGTATTTCTTACAATGGAGG GCCAAGGAGGGCAAGGGGCTGTGGAGTTTGGT GTCTACTAGTGTGTATGAATTTGAGCTAGAGTC CTTCTGTGGCATGCACTTTGACCACTCCTGGCA GTCACATGGCAGATTTCCAAGTGCAAATCCTTA ATCCAAACAAGGATCATCTAATGACACCACCAG GCCAATCCCTGCTCTCCTCCCCGAAAAGTCAGG GTCCCTTCATTGGAATCCTCCACCCACCCAAGC AGAATTTAGCAGAGATTTGCCTTCAAACCCTAA

SEQ ID NO:	描述	序列
		CGGCCCCCTTGTTCTCTGGTCCTTCTCAAACCCA CCTTTGTAGGCCACCCAGCATTGCAGGACAGCG TGTGGGGCAGCTGGACCTGTGCTTCCTGCCTGG GAGTCTCCCTTGGAATTCATCCTGACTCCTTCTA ATAAAAATGGATGGGAAAGCAAAACACTTTGC CTTCTAAAGGCCGTATACCAAGTATGCTTAGAT AAATAAGCCACTTTTCTATTACTTAAGTAAGAA GGAAGTAGTAATTGATACTATTTATTGTTTGTGT GTGGTAGCTTGAAGCACACCACTGTCCATTTAT TTGTAAGTGTAAAATATGTGTGTTTGTTTCAGC AGCACTTAAAAAAGCCAGTGTCTGGTTACACAT TTCAATTTTAATTAATTGACATAAAAATGCTAC CGCCAGTGCCAGCTGCATCCTATTTAATTAAAA AGGTACTATATTTGTACATTATTTTTTAATGTTA AAAGGGCTTTTTTAAGTTTACAGTACACATACC GAGTGACTTTAGGGATGCTTTTGTGTTGAAATG TTACTATAGTGGCTGCAGGCAGCAACCCAGAAA CACTTTAGAAGCTTTTTTTCCTTGGGAAAAATTC AAGCACTTCTTCCCTCCACCCTCACTCCAACCA CCCCAATGGGGGTAATTCACATTTCTTAGAACA AATTCTGCCCTTTTTTGGTCTAGGGATTAAAATT TTGTTTTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTCACT GAACCCTTAATTTGCACTGGGTCATGTGTTTGA TTTGTGATTTCAAGACCAAAGCAAAGTCTTACT ACTACTGTGGAACCATGTACTAGTTCCTGGGAA TTAAAATAGCGTGGTTCTCTTTGTAGCACAAAC ATTGCTGGAATTTGCAGTCTTTTCAATGCAGCC ACATTTTTATCCATTTCAGTTGTCTCACAAATTT TAACCCATATCAGAGTTCCAGAACAGGTACCAC AGCTTTGGTTTTAGATTAGTGGAATAACATTCA GCCCAGAACTGAGAAACTCAACAGATTAACTAT CGTTTGCTCTTTAGACGGTCTCACTGCCTCTCAC TTGCCAGAGCCCTTTCAAAATGAGCAGAGAAGT CCACACCATTAGGGACCATCTGTGATAAATTCA GAAGGGAGGAGATGTGTGTACAGCTTTAAGGA TTCCCTCAATTCCGAGGAAAGGGACTGGCCCAG AATCCAGGTTAATACATGGAAACACGAAGCATT AGCAAAAGTAATAATTATACCTATGGTATTTGA AAGAACAATAATAAAAGACACTTCTTCCAAACC TTGAATTTGTTGTTTTTAGAAAACGAATGCATTT AAAAATATTTTCTATGTGAGAATTTTTTAGATGT GTGTTTACTTCATGTTTACAAATAACTGTTTGCT TTTTAATGCAGTACTTTGAAATATATCAGCCAA AACCATAACTTACAATAATTTCTTAGGTATTCT GAATAAAATTCCATTTCTTTTGGATATGCTTTAC CATTCTTAGGTTTCTGTGGAACAAAAATATTTG TAGCATTTTGTGTAAATACAAGCTTTCATTTTTA TTTTTTCCAATTGCTATTGCCCAAGAATTGCTTT CCATGCACATATTGTAAAAATTCCGCTTTGTGC

SEQ ID NO:	描述	序列
		CACAGGTCATGATTGTGGATGAGTTTACTCTTA ACTTCAAAGGGACTATTTGTATTGTATGTTGCA ACTGTAAATTGAATTATTTGGCATTTTTCTCATG ATTGTAATATTAATTTGAAGTTTGAATTTAATTT TCAATAAAATGGCTTTTTTGGTTTTGTTA
59	人類Alp mRNA	CCGGGCCTCACTCGGGCCCCGCGGCCGCCTTTA TAAGGCGGCGGGGGTGGTGGCCCGGGCCGCGT TGCGCTCCCGCCACTCCGCGCCCGCTATCCTGG CTCCGTGCTCCCACGCGCTTGTGCCTGGACGGA CCCTCGCCAGTGCTCTGCGCAGGATTGGAACAT CAGTTAACATCTGACCACTGCCAGCCCACCCCC TCCCACCCACGTCGATTGCATCTCTGGGCTCCA GGGATAAAGCAGGTCTTGGGGTGCACCATGATT TCACCATTCTTAGTACTGGCCATTGGCACCTGC CTTACTAACTCCTTAGTGCCAGAGAAAGAGAAA GACCCCAAGTACTGGCGAGACCAAGCGCAAGA GACACTGAAATATGCCCTGGAGCTTCAGAAGCT CAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTT CCTGGGAGATGGGATGGGTGTCTCCACAGTGAC GGCTGCCCGCATCCTCAAGGGTCAGCTCCACCA CAACCCTGGGGAGGAGACCAGGCTGGAGATGG ACAAGTTCCCCTTCGTGGCCCTCTCCAAGACGT ACAACACCAATGCCCAGGTCCCTGACAGCGCC GGCACCGCCACCGCCTACCTGTGTGGGGTGAAG GCCAATGAGGGCACCGTGGGGGTAAGCGCAGC CACTGAGCGTTCCCGGTGCAACACCACCCAGGG GAACGAGGTCACCTCCATCCTGCGCTGGGCCAA GGACGCTGGGAAATCTGTGGGCATTGTGACCAC CACGAGAGTGAACCATGCCACCCCCAGCGCCG CCTACGCCCACTCGGCTGACCGGGACTGGTACT CAGACAACGAGATGCCCCCTGAGGCCTTGAGCC AGGGCTGTAAGGACATCGCCTACCAGCTCATGC ATAACATCAGGGACATTGACGTGATCATGGGG GGTGGCCGGAAATACATGTACCCCAAGAATAA AACTGATGTGGAGTATGAGAGTGACGAGAAAG CCAGGGGCACGAGGCTGGACGGCCTGGACCTC GTTGACACCTGGAAGAGCTTCAAACCGAGATAC AAGCACTCCCACTTCATCTGGAACCGCACGGAA CTCCTGACCCTTGACCCCCACAATGTGGACTAC CTATTGGGTCTCTTCGAGCCAGGGGACATGCAG TACGAGCTGAACAGGAACAACGTGACGGACCC GTCACTCTCCGAGATGGTGGTGGTGGCCATCCA GATCCTGCGGAAGAACCCCAAAGGCTTCTTCTT GCTGGTGGAAGGAGGCAGAATTGACCACGGGC ACCATGAAGGAAAAGCCAAGCAGGCCCTGCAT GAGGCGGTGGAGATGGACCGGGCCATCGGGCA GGCAGGCAGCTTGACCTCCTCGGAAGACACTCT GACCGTGGTCACTGCGGACCATTCCCACGTCTT CACATTTGGTGGATACACCCCCCGTGGCAACTC

SEQ ID NO:	描述	序列
		TATCTTTGGTCTGGCCCCCATGCTGAGTGACAC AGACAAGAAGCCCTTCACTGCCATCCTGTATGG CAATGGGCCTGGCTACAAGGTGGTGGGCGGTG AACGAGAGAATGTCTCCATGGTGGACTATGCTC ACAACAACTACCAGGCGCAGTCTGCTGTGCCCC TGCGCCACGAGACCCACGGCGGGGAGGACGTG GCCGTCTTCTCCAAGGGCCCCATGGCGCACCTG CTGCACGGCGTCCACGAGCAGAACTACGTCCCC CACGTGATGGCGTATGCAGCCTGCATCGGGGCC AACCTCGGCCACTGTGCTCCTGCCAGCTCGGCA GGCAGCCTTGCTGCAGGCCCCCTGCTGCTCGCG CTGGCCCTCTACCCCCTGAGCGTCCTGTTCTGA GGGCCCAGGGCCCGGGCACCCACAAGCCCGTG ACAGATGCCAACTTCCCACACGGCAGCCCCCCC CTCAAGGGGCAGGGAGGTGGGGGCCTCCTCAG CCTCTGCAACTGCAAGAAAGGGGACCCAAGAA ACCAAAGTCTGCCGCCCACCTCGCTCCCCTCTG GAATCTTCCCCAAGGGCCAAACCCACTTCTGGC CTCCAGCCTTTGCTCCCTCCCCGCTGCCCTTTGG CCAACAGGGTAGATTTCTCTTGGGCAGGCAGAG AGTACAGACTGCAGACATTCTCAAAGCCTCTTA TTTTTCTAGCGAACGTATTTCTCCAGACCCAGA GGCCCTGAAGCCTCCGTGGAACATTCTGGATCT GACCCTCCCAGTCTCATCTCCTGACCCTCCCACT CCCATCTCCTTACCTCTGGAACCCCCCAGGCCC TACAATGCTCATGTCCCTGTCCCCAGGCCCAGC CCTCCTTCAGGGGAGTTGAGGTCTTTCTCCTCA GGACAAGGCCTTGCTCACTCACTCACTCCAAGA CCACCAGGGTCCCAGGAAGCCGGTGCCTGGGT GGCCATCCTACCCAGCGTGGCCCAGGCCGGGA AGAGCCACCTGGCAGGGCTCACACTCCTGGGCT CTGAACACACACGCCAGCTCCTCTCTGAAGCGA CTCTCCTGTTTGGAACGGCAAAAAAAAATTTTT TTTTCTCTTTTTGGTGGTGGTTAAAAGGGAACA CAAAACATTTAAATAAAACTTTCCAAATATTTC CGAGGACAAAAAAAAAAA
60	人類奧斯特里克斯mRNA	CGGCGGGCGGCAGCAGCCTAGGCAGCAGCAGT AGCAGAAGCAGCAGCCGCCGAGCAGCAGCAAG GACTCTGGAGTCAGAGTAGGACTGTAGGACCG GAGCCTGAGTGGAACAGGAGTGGAGCTGGCCT GGGAGAGAGCGGATCCCTCCCAGCACCCTCAG GCCACCCGTTGCCTGCACTCTCCCTGCCAGACC TCCAGAGAGGAGAGACTCGGGACAGCCAGCCC CAGGTTCCCCCAGCTCTCTCCATCTGCCTGGCTC CTTGGGACCCGTTCCCCAGCCTCAGGATGGCGT CCTCCCTGCTTGAGGAGGAAGTTCACTATGGCT CCAGTCCCCTGGCCATGCTGACGGCAGCGTGCA GCAAATTTGGTGGCTCTAGCCCTCTGCGGGACT CAACAACTCTGGGCAAAGCAGGCACAAAGAAG

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCGTACTCTGTGGGCAGTGACCTTTCAGCCTCC AAAACCATGGGGGATGCTTATCCAGCCCCCTTT ACAAGCACTAATGGGCTCCTTTCACCTGCAGGC AGTCCTCCAGCACCCACCTCAGGCTATGCTAAT GATTACCCTCCCTTTTCCCACTCATTCCCTGGGC CCACAGGCACCCAGGACCCTGGGCTACTAGTGC CCAAGGGGCACAGCTCTTCTGACTGTCTGCCCA GTGTCTACACCTCTCTGGACATGACACACCCCT ATGGCTCCTGGTACAAGGCAGGCATCCATGCAG GCATTTCACCAGGCCCAGGCAACACTCCTACTC CATGGTGGGATATGCACCCTGGAGGCAACTGGC TAGGTGGTGGGCAGGGCCAGGGTGATGGGCTG CAAGGGACACTGCCCACAGGTCCAGCTCAGCCT CCACTGAACCCCCAGCTGCCCACCTACCCATCT GACTTTGCTCCCCTTAATCCAGCCCCCTACCCA GCTCCCCACCTCTTGCAACCAGGGCCCCAGCAT GTCTTGCCCCAAGATGTCTATAAACCCAAGGCA GTGGGAAATAGTGGGCAGCTAGAAGGGAGTGG TGGAGCCAAACCCCCACGGGGTGCAAGCACTG GGGGTAGTGGTGGATATGGGGGCAGTGGGGCA GGGCGCTCCTCCTGCGACTGCCCTAATTGCCAG GAGCTAGAGCGGCTGGGAGCAGCAGCGGCTGG GCTGCGGAAGAAGCCCATCCACAGCTGCCACAT CCCTGGCTGCGGCAAGGTGTATGGCAAGGCTTC GCACCTGAAGGCCCACTTGCGCTGGCACACAGG CGAGAGGCCCTTCGTCTGCAACTGGCTCTTCTG CGGCAAGAGGTTCACTCGTTCGGATGAGCTGGA GCGTCATGTGCGCACTCACACCCGGGAGAAGA AGTTCACCTGCCTGCTCTGCTCCAAGCGCTTTAC CCGAAGCGACCACCTGAGCAAACACCAGCGCA CCCATGGAGAACCAGGCCCGGGTCCCCCTCCCA GTGGCCCCAAGGAGCTGGGGGAGGGCCGCAGC ACGGGGGAAGAGGAGGCCAGTCAGACGCCCCG ACCTTCTGCCTCGCCAGCAACCCCAGAGAAAGC CCCTGGAGGCAGCCCTGAGCAGAGCAACTTGCT GGAGATCTGAGCCGGGTGGAAGGTCTCCCACCC CAGGGCTGCCCTGACAGTCTCTCTTGGCTCTCT AGACCACTGCTTGCCAATCACTCTCTTTACCCC ATGCATGCCATCCTTCGGGGCTCTCTCCCTCTGT CTCCCTCCTGGCCATTCTGGGCTTGGGTATCTCC TTGCATGCCTCCTCAGCTCACCTTCTCTCTTCAC CATGAGACTGGCTTTCCACAAACTCTCATCTCA GGCCCTCCCCTTGTGCCTGATACCTGCACTCCG GCTTCCTAGACTCTGGCCCTGCCACACCAACAC ACTTTCTATTTGGGCTCCCAACACTATTTCTCCA TCTCACTCCTTGACATGTACCCCTTTCTGCTTCT CAAGCTTATTTCCTGCTGTCCCTCAGCCTCCAGG CTTCAGTCTTCCCAACTTCTTACACCATTGCTTT CCATTCTCCAGAACTCTTTTTTCCTTTTTACAAA

SEQ ID NO:	描述	序列
		CACAATGATAATGATAATTTATTGCCCCCTGGT GGCCTCTTCATCAGGGGTATTGGGGTTAGTGAC CTGGCCAGAGGGTGCCAAGAGGGGGGCAGACC AGTGGGGATCTGATCCCAAAGATGGGGTGACC CCAGGGTCAGGGAGGCTGCCCCCAGGCCTGTAT ATTTAACCCCTATGTACCAGGAGTAATGAATAG TAATAATTCTATTTATGTAAGTTATGATGACGG GTCAGGTAGAGTGAGCTGGGGAGGGAAGTGGA TCCATTTCTGCTAAGGAAATTCTAGTCAAATGC ATCTCTGTATAGACAAAATGTTAGTGGAGAAGA TCTTGTTAATAGAATGTCTATCATCAGAATCTC AGTTGATAGGGTTTCTCTTGTAATGAAGTCTCT ACAAATTGGGTTAGCTACATCTCTGCTAAACAG TTGATGGGGTATCTCTTGATTAGGGGGATCCCT AATATCCCCAGCCCCAGCCAGAAGCTGTGAAAC CTCAAGTCCTATGGAGGGGAGAAGGACTGGAA TGTACCCCATCTCCCTTGACTGCAGAGCAGGTT CCTCCACTGCCCCACCCCTTAGACACCATGACC CCATCAGGTTAATCCCCTGTTGCCATGGTTATG GAGAGCTTGCAGCTGCCATCTTAGATGTGCTCT TTGGGGAAGCCCATCTAACAGGAGGACATTGGT TTGGGGGTGCACCTCCTGAAGAATGGGTGGGG AAGGCTTTCTCTAGGATCAGATTCAAATAAGTA TGTATTGAGTGCCTACTCTGTGCAAGGCACTAT GCTAGATCTGGTGCCTAGAAGCCCTGAGAAAG AACTTAAAGAGCTAGGAGGACAGAGGCCCCCA AGCTGATCTGGTGGTGCATCCACGCACCCCCAC CCTGGGACTTTGGATGCTCCCATCTCCACCTCC AGTGACTTTTAAAGCCGCTTCGTGCCTTTCCTGT AACGTTGGATCCTCCTTTTCTGTCCCCTGCTGTC TCAAGGCCCCAAGTTAAAGGGTTAAAGCCGCTG GAGCTTGGGGAGAGAACATTGTGGAATGGAAG GGATCATGCCCTTTGTGGAGTCTTTTTTTTTTAA TTTAATAAATAAAAGTTGGATTTGAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA
61	人類克羅索mRNA	CGCGCAGCATGCCCGCCAGCGCCCCGCCGCGCC GCCCGCGGCCGCCGCCGCCGTCGCTGTCGCTGC TGCTGGTGCTGCTGGGCCTGGGCGGCCGCCGCC TGCGTGCGGAGCCGGGCGACGGCGCGCAGACC TGGGCCCGTGTCTCGCGGCCTCCTGCCCCCGAG GCCGCGGGCCTCTTCCAGGGCACCTTCCCCGAC GGCTTCCTCTGGGCCGTGGGCAGCGCCGCCTAC CAGACCGAGGGCGGCTGGCAGCAGCACGGCAA GGGTGCGTCCATCTGGGACACGTTCACCCACCA CCCCCTGGCACCCCCGGGAGACTCCCGGAACGC CAGTCTGCCGTTGGGCGCCCCGTCGCCGCTGCA GCCCGCCACCGGGGACGTAGCCAGCGACAGCT ACAACAACGTCTTCCGCGACACGGAGGCGCTGC GCGAGCTCGGGGTCACTCACTACCGCTTCTCCA

SEQ ID NO:	描述	序列
		TCTCGTGGGCGCGAGTGCTCCCCAATGGCAGCG CGGGCGTCCCCAACCGCGAGGGGCTGCGCTACT ACCGGCGCCTGCTGGAGCGGCTGCGGGAGCTG GGCGTGCAGCCCGTGGTCACCCTGTACCACTGG GACCTGCCCCAGCGCCTGCAGGACGCCTACGGC GGCTGGGCCAACCGCGCCCTGGCCGACCACTTC AGGGATTACGCGGAGCTCTGCTTCCGCCACTTC GGCGGTCAGGTCAAGTACTGGATCACCATCGAC AACCCCTACGTGGTGGCCTGGCACGGCTACGCC ACCGGGCGCCTGGCCCCCGGCATCCGGGGCAG CCCGCGGCTCGGGTACCTGGTGGCGCACAACCT CCTCCTGGCTCATGCCAAAGTCTGGCATCTCTA CAATACTTCTTTCCGTCCCACTCAGGGAGGTCA GGTGTCCATTGCCCTAAGCTCTCACTGGATCAA TCCTCGAAGAATGACCGACCACAGCATCAAAG AATGTCAAAAATCTCTGGACTTTGTACTAGGTT GGTTTGCCAAACCCGTATTTATTGATGGTGACT ATCCCGAGAGCATGAAGAATAACCTTTCATCTA TTCTGCCTGATTTTACTGAATCTGAGAAAAAGT TCATCAAAGGAACTGCTGACTTTTTTGCTCTTTG CTTTGGACCCACCTTGAGTTTTCAACTTTTGGAC CCTCACATGAAGTTCCGCCAATTGGAATCTCCC AACCTGAGGCAACTGCTTTCCTGGATTGACCTT GAATTTAACCATCCTCAAATATTTATTGTGGAA AATGGCTGGTTTGTCTCAGGGACCACCAAGAGA GATGATGCCAAATATATGTATTACCTCAAAAAG TTCATCATGGAAACCTTAAAAGCCATCAAGCTG GATGGGGTGGATGTCATCGGGTATACCGCATGG TCCCTCATGGATGGTTTCGAGTGGCACAGAGGT TACAGCATCAGGCGTGGACTCTTCTATGTTGAC TTTCTAAGCCAGGACAAGATGTTGTTGCCAAAG TCTTCAGCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAG AAAAATGGCTTCCCTCCTTTACCTGAAAATCAG CCCCTAGAAGGGACATTTCCCTGTGACTTTGCT TGGGGAGTTGTTGACAACTACATTCAAGTAGAT ACCACTCTGTCTCAGTTTACCGACCTGAATGTTT ACCTGTGGGATGTCCACCACAGTAAAAGGCTTA TTAAAGTGGATGGGGTTGTGACCAAGAAGAGG AAATCCTACTGTGTTGACTTTGCTGCCATCCAG CCCCAGATCGCTTTACTCCAGGAAATGCACGTT ACACATTTTCGCTTCTCCCTGGACTGGGCCCTG ATTCTCCCTCTGGGTAACCAGTCCCAGGTGAAC CACACCATCCTGCAGTACTATCGCTGCATGGCC AGCGAGCTTGTCCGTGTCAACATCACCCCAGTG GTGGCCCTGTGGCAGCCTATGGCCCCGAACCAA GGACTGCCGCGCCTCCTGGCCAGGCAGGGCGC CTGGGAGAACCCCTACACTGCCCTGGCCTTTGC AGAGTATGCCCGACTGTGCTTTCAAGAGCTCGG CCATCACGTCAAGCTTTGGATAACGATGAATGA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCCGTATACAAGGAATATGACATACAGTGCTGG CCACAACCTTCTGAAGGCCCATGCCCTGGCTTG GCATGTGTACAATGAAAAGTTTAGGCATGCTCA GAATGGGAAAATATCCATAGCCTTGCAGGCTGA TTGGATAGAACCTGCCTGCCCTTTCTCCCAAAA GGACAAAGAGGTGGCCGAGAGAGTTTTGGAAT TTGACATTGGCTGGCTGGCTGAGCCCATTTTCG GCTCTGGAGATTATCCATGGGTGATGAGGGACT GGCTGAACCAAAGAAACAATTTTCTTCTTCCTT ATTTCACTGAAGATGAAAAAAAGCTAATCCAG GGTACCTTTGACTTTTTGGCTTTAAGCCATTATA CCACCATCCTTGTAGACTCAGAAAAAGAAGATC CAATAAAATACAATGATTACCTAGAAGTGCAA GAAATGACCGACATCACGTGGCTCAACTCCCCC AGTCAGGTGGCGGTAGTGCCCTGGGGGTTGCGC AAAGTGCTGAACTGGCTGAAGTTCAAGTACGG AGACCTCCCCATGTACATAATATCCAACGGAAT CGATGACGGGCTGCATGCTGAGGACGACCAGC TGAGGGTGTATTATATGCAGAATTACATAAACG AAGCTCTCAAAGCCCACATACTGGATGGTATCA ATCTTTGCGGATACTTTGCTTATTCGTTTAACGA CCGCACAGCTCCGAGGTTTGGCCTCTATCGTTA TGCTGCAGATCAGTTTGAGCCCAAGGCATCCAT GAAACATTACAGGAAAATTATTGACAGCAATG GTTTCCCGGGCCCAGAAACTCTGGAAAGATTTT GTCCAGAAGAATTCACCGTGTGTACTGAGTGCA GTTTTTTTCACACCCGAAAGTCTTTACTGGCTTT CATAGCTTTTCTATTTTTTGCTTCTATTATTTCTC TCTCCCTTATATTTTACTACTCGAAGAAAGGCA GAAGAAGTTACAAATAGTTCTGAACATTTTTCT ATTCATTCATTTTGAAATAATTATGCAGACACA TCAGCTGTTAACCATTTGCACCTCTAAGTGTTGT GAAACTGTAAATTTCATACATTTGACTTCTAGA AAACATTTTTGTGGCTTATGACAGAGGTTTTGA AATGGGCATAGGTGATCGTAAAATATTGAATAA TGCGAATAGTGCCTGAATTTGTTCTCTTTTTGGG TGATTAAAAAACTGACAGGCACTATAATTTCTG TAACACACTAACAAAAGCATGAAAAATAGGAA CCACACCAATGCAACATTTGTGCAGAAATTTGA ATGACAAGATTAGGAATATTTTCTTCTGCACCC ACTTCTAAATTTAATGTTTTTCTGGAAGTAGTAA TTGCAAGAGTTCGAATAGAAAGTTATGTACCAA GTAACCATTTCTCAGCTGCCATAATAATGCCTA GTGGCTTCCCCTCTGTCAAATCTAGTTTCCTATG GAAAAGAAGATGGCAGATACAGGAGAGACGAC AGAGGGTCCTAGGCTGGAATGTTCCTTTCGAAA GCAATGCTTCTATCAAATACTAGTATTAATTTAT GTATCTGGTTAATGACATACTTGGAGAGCAAAT TATGGAAATGTGTATTTTATATGATTTTTGAGGT

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCTGTCTAAACCCTGTGTCCCTGAGGGATCTGT CTCACTGGCATCTTGTTGAGGGCCTTGCACATA GGAAACTTTTGATAAGTATCTGCGGAAAAACAA ACATGAATCCTGTGATATTGGGCTCTTCAGGAA GCATAAAGCAATTGTGAAATACAGTATACCGCA GTGGCTCTAGGTGGAGGAAAGGAGGAAAAAGT GCTTATTATGTGCAACATTATGATTAATCTGATT ATACACCATTTTTGAGCAGATCTTGGAATGAAT GACATGACCTTTCCCTAGAGAATAAGGATGAAA TAATCACTCATTCTATGAACAGTGACACTACTT TCTATTCTTTAGCTGTACTGTAATTTCTTTGAGT TGATAGTTTTACAAATTCTTAATAGGTTCAAAA GCAATCTGGTCTGAATAACACTGGATTTGTTTC TGTGATCTCTGAGGTCTATTTTATGTTTTTGCTG CTACTTCTGTGGAAGTAGCTTTGAACTAGTTTTA CTTTGAACTTTCACGCTGAAACATGCTAGTGAT ATCTAGAAAGGGCTAATTAGGTCTCATCCTTTA ATGCCCCTTAAATAAGTCTTGCTGATTTTCAGA CAGGGAAGTCTCTCTATTACACTGGAGCTGTTT TATAGATAAGTCAATATTGTATCAGGCAAGATA AACCAATGTCATAACAGGCATTGCCAACCTCAC TGACACAGGGTCATAGTGTATAATAATATACTG TACTATATAATATATCATCTTTAGAGGTATGATT TTTTCATGAAAGATAAGCTTTTGGTAATATTCAT TTTAAAGTGGACTTATTAAAATTGGATGCTAGA GAATCAAGTTTATTTTATGTATATATTTTTCTGA TTATAAGAGTAATATATGTTCATTGTAAAAATT TTTAAAACACAGAAACTATATGCAAAGAAAAA ATAAAAATTATCTATAATCTCAGAACCCAGAAA TAGCCACTATTAACATTTCCTACGTATTTTATTT TACATAGATCATATTGTATATAGTTAGTATCTTT ATTAATTTTTATTATGAAACTTTCCTTTGTCATT ATTAGTCTTCAAAAGCATGATTTTTAATAGTTGT TGAGTATTCCACCACAGGAATGTATCACAACTT AACCGTTCCCGTTTGTTAGACTAGTTTCTTATTA ATGTTGATGAATGTTGTTTAAAAATAATTTTGTT GCTACATTTACTTTAATTTCCTTGACTGTAAAGA GAAGTAATTTTGCTCCTTGATAAAGTATTATATT AATAATAAATCTGCCTGCAACTTTTTGCCTTCTT TCATAATC
62	人類Sm22-α mRNA	TCACCACGGCGGCAGCCCTTTAAACCCCTCACC CAGCCAGCGCCCCATCCTGTCTGTCCGAACCCA GACACAAGTCTTCACTCCTTCCTGCGAGCCCTG AGGAAGCCTTGTGAGTGCATTGGCTGGGGCTTG GAGGGAAGTTGGGCTGGAGCTGGACAGGAGCA GTGGGTGCATTTCAGGCAGGCTCTCCTGAGGTC CCAGGCGCCAGCTCCAGCTCCCTGGCTAGGGAA ACCCACCCTCTCAGTCAGCATGGGGGCCCAAGC TCCAGGCAGGGTGGGCTGGATCACTAGCGTCCT

SEQ ID NO:	描述	序列
		GGATCTCTCTCAGACTGGGCAGCCCCGGGCTCA TTGAAATGCCCCGGATGACTTGGCTAGTGCAGA GGAATTGATGGAAACCACCGGGGTGAGAGGGA GGCTCCCCATCTCAGCCAGCCACATCCACAAGG TGTGTGTAAGGGTGCAGGCGCCGGCCGGTTAGG CCAAGGCTCTACTGTCTGTTGCCCCTCCAGGAG AACTTCCAAGGAGCTTTCCCCAGACATGGCCAA CAAGGGTCCTTCCTATGGCATGAGCCGCGAAGT GCAGTCCAAAATCGAGAAGAAGTATGACGAGG AGCTGGAGGAGCGGCTGGTGGAGTGGATCATA GTGCAGTGTGGCCCTGATGTGGGCCGCCCAGAC CGTGGGCGCTTGGGCTTCCAGGTCTGGCTGAAG AATGGCGTGATTCTGAGCAAGCTGGTGAACAGC CTGTACCCTGATGGCTCCAAGCCGGTGAAGGTG CCCGAGAACCCACCCTCCATGGTCTTCAAGCAG ATGGAGCAGGTGGCTCAGTTCCTGAAGGCGGCT GAGGACTATGGGGTCATCAAGACTGACATGTTC CAGACTGTTGACCTCTTTGAAGGCAAAGACATG GCAGCAGTGCAGAGGACCCTGATGGCTTTGGGC AGCTTGGCAGTGACCAAGAATGATGGGCACTA CCGTGGAGATCCCAACTGGTTTATGAAGAAAGC GCAGGAGCATAAGAGGGAATTCACAGAGAGCC AGCTGCAGGAGGGAAAGCATGTCATTGGCCTTC AGATGGGCAGCAACAGAGGGGCCTCCCAGGCC GGCATGACAGGCTACGGACGACCTCGGCAGAT CATCAGTTAGAGCGGAGAGGGCTAGCCCTGAG CCCGGCCCTCCCCCAGCTCCTTGGCTGCAGCCA TCCCGCTTAGCCTGCCTCACCCACACCCGTGTG GTACCTTCAGCCCTGGCCAAGCTTTGAGGCTCT GTCACTGAGCAATGGTAACTGCACCTGGGCAGC TCCTCCCTGTGCCCCCAGCCTCAGCCCAACTTCT TACCCGAAAGCATCACTGCCTTGGCCCCTCCCT CCCGGCTGCCCCCATCACCTCTACTGTCTCCTCC CTGGGCTAAGCAGGGGAGAAGCGGGCTGGGGG TAGCCTGGATGTGGGCCAAGTCCACTGTCCTCC TTGGCGGCAAAAGCCCATTGAAGAAGAACCAG CCCAGCCTGCCCCCTATCTTGTCCTGGAATATTT TTGGGGTTGGAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA ATCAATCTTTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
63	人類Runx2蛋白	MASNSLFSTVTPCQQNFFWDPSTSRRFSPPSSSLQP GKMSDVSPVVAAQQQQQQQQQQQQQQQQQQ QQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAVPRLRPPHDN RTMVEIIADHPAELVRTDSPNFLCSVLPSHWRCNK TLPVAFKVVALGEVPDGTVVTVMAGNDENYSAE LRNASAVMKNQVARFNDLRFVGRSGRGKSFTLTI TVFTNPPQVATYHRAIKVTVDGPREPRRHRQKLD DSKPSLFSDRLSDLGRIPHPSMRVGVPPQNPRPSL NSAPSPFNPQGQSQITDPRQAQSSPPWSYDQSYPS YLSQMTSPSIHSTTPLSSTRGTGLPAITDVPRRISD

SEQ ID NO:	描述	序列
		DDTATSDFCLWPSTLSKKSQAGASELGPFSDPRQF PSISSLTESRFSNPRMHYPATFTYTPPVTSGMSLG MSATTHYHTYLPPPYPGSSQSQSGPFQTSSTPYLY YGTSSGSYQFPMVPGGDRSPSRMLPPCTTTSNGST LLNPNLPNQNDGVDADGSHSSSPTVLNSSGRMDE SVWRPY
64	人類Alp蛋白	MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQ ETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTV TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTY NTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAAT ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTR VNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDV EYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSHF IWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRN NVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRID HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSED TLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDT DKKPFTAILYGNGPGYKVVGGERENVSMVDYAH NNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLL HGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAG SLAAGPLLLALALYPLSVLF
65	人類奧斯特里克斯蛋白	MASSLLEEEVHYGSSPLAMLTAACSKFGGSSPLR DSTTLGKAGTKKPYSVGSDLSASKTMGDAYPAPF TSTNGLLSPAGSPPAPTSGYANDYPPFSHSFPGPTG TQDPGLLVPKGHSSSDCLPSVYTSLDMTHPYGSW YKAGIHAGISPGPGNTPTPWWDMHPGGNWLGGG QGQGDGLQGTLPTGPAQPPLNPQLPTYPSDFAPL NPAPYPAPHLLQPGPQHVLPQDVYKPKAVGNSG QLEGSGGAKPPRGASTGGSGGYGGSGAGRSSCDC PNCQELERLGAAAAGLRKKPIHSCHIPGCGKVYG KASHLKAHLRWHTGERPFVCNWLFCGKRFTRSD ELERHVRTHTREKKFTCLLCSKRFTRSDHLSKHQ RTHGEPGPGPPPSGPKELGEGRSTGEEEASQTPRP SASPATPEKAPGGSPEQSNLLEI
66	人類克羅索蛋白	MPASAPPRRPRPPPPSLSLLLVLLGLGGRRLRAEP GDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGFLWA VGSAAYQTEGGWQQHGKGASIWDTFTHHPLAPP GDSRNASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRD TEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREG LRYYRRLLERLRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQD AYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFGGQVKYW ITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVA HNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSH WINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAKPVFIDG DYPESMKNNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCF GPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFN HPQIFIVENGWFVSGTTKRDDAKYMYYLKKFIME TLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRR

SEQ ID NO:	描述	序列
		GLFYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIEKNGFPPL PENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTD LNVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFA AIQPQIALLQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQV NHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPN QGLPRLLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQEL GHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALA WHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSQK DKEVAERVLEFDIGWLAEPIFGSGDYPWVMRDW LNQRNNFLLPYFTEDEKKLIQGTFDFLALSHYTTIL VDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAV VPWGLRKVLNWLKFKYGDLPMYIISNGIDDGLHA EDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAY SFNDRTAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIID SNGFPGPETLERFCPEEFTVCTECSFFHTRKSLLAF IAFLFFASIISLSLIFYYSKKGRRSYK
67	人類Sm22-α蛋白	MANKGPSYGMSREVQSKIEKKYDEELEERLVEWI IVQCGPDVGRPDRGRLGFQVWLKNGVILSKLVNS LYPDGSKPVKVPENPPSMVFKQMEQVAQFLKAA EDYGVIKTDMFQTVDLFEGKDMAAVQRTLMALG SLAVTKNDGHYRGDPNWFMKKAQEHKREFTESQ LQEGKHVIGLQMGSNRGASQAGMTGYGRPRQIIS
68	人類α-SMA蛋白	MCEEEDSTALVCDNGSGLCKAGFAGDDAPRAVF PSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGI LTLKYPIEHGIITNWDDMEKIWHHSFYNELRVAPE EHPTLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMY VAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEG YALPHAIMRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVT TAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLE KSYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAG IHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNVLSGGTTMYPG IADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGS ILASLSTFQQMWISKQEYDEAGPSIVHRKCF
69	人類MYOCD蛋白	MTLLGSEHSLLIRSKFRSVLQLRLQQRRTQEQLAN QGIIPPLKRPAEFHEQRKHLDSDKAKNSLKRKARN RCNSADLVNMHILQASTAERSIPTAQMKLKRARL ADDLNEKIALRPGPLELVEKNILPVDSAVKEAIKG NQVSFSKSTDAFAFEEDSSSDGLSPDQTRSEDPQN SAGSPPDAKASDTPSTGSLGTNQDLASGSENDRN DSASQPSHQSDAGKQGLGPPSTPIAVHAAVKSKS LGDSKNRHKKPKDPKPKVKKLKYHQYIPPDQKA EKSPPPMDSAYARLLQQQQLFLQLQILSQQQQQQ QHRFSYLGMHQAQLKEPNEQMVRNPNSSSTPLSN TPLSPVKNSFSGQTGVSSFKPGPLPPNLDDLKVSE LRQQLRIRGLPVSGTKTALMDRLRPFQDCSGNPV PNFGDITTVTFPVTPNTLPNYQSSSSTSALSNGFYH FGSTSSSPPISPASSDLSVAGSLPDTFNDASPSFGLH PSPVHVCTEESLMSSLNGGSVPSELDGLDSEKDK MLVEKQKVINELTWKLQQEQRQVEELRMQLQKQ

SEQ ID NO:	描述	序列
		KRNNCSEKKPLPFLAASIKQEEAVSSCPFASQVPV KRQSSSSECHPPACEAAQLQPLGNAHCVESSDQT NVLSSTFLSPQCSPQHSPLGAVKSPQHISLPPSPNN PHFLPSSSGAQGEGHRVSSPISSQVCTAQNSGAHD GHPPSFSPHSSSLHPPFSGAQADSSHGAGGNPCPK SPCVQQKMAGLHSSDKVGPKFSIPSPTFSKSSSAIS EVTQPPSYEDAVKQQMTRSQQMDELLDVLIESGE MPADAREDHSCLQKVPKIPRSSRSPTAVLTKPSAS FEQASSGSQIPFDPYATDSDEHLEVLLNSQSPLGK MSDVTLLKIGSEEPHFDGIMDGFSGKAAEDLFNA HEILPGPLSPMQTQFSPSSVDSNGLQLSFTESPWET MEWLDLTPPNSTPGFSALTTSSPSIFNIDFLDVTDL NLNSSMDLHLQQW
70	人類α-SMA mRNA	CTCTCCCCGCCCCCGCGGGGCGGCGCGCACTCA CCCACCCGCGCCGGAGCGGACCTTTGGCTTGGC TTGTCAGGGCTTGTCCAGGAGTTCCGCTCCTCTC TCCAACCGGGGTCCCCCTCCAGCGACCCTAAAG CTTCCCAGACTTCCGCTTCAATTCCTGTCCGCAC CCCACGCCCACCTCAACGTGGAGCGCAGTGGTC TCCGAGGAGCGCCGGAGCTGCCCCGCCTGCCCA GCGGGGTCAGCACTTCGCATCAAGGCCCAAGA AAAGCAAGTCCTCCAGCGTTCTGAGCACCCGGG CCTGAGGGAAGGTCCTAACAGCCCCCGGGAGC CAGTCTCCAACGCCTCCCGCAGCAGCCCGCCGC TCCCAGGTGCCCGCGTGCGCCGCTGCCGCCGCA ATCCCGCACGCGTCCCGCGCCCGCCCCACTTTG CCTATCCCCGGGACTAAGACGGGAATCCTGTGA AGCAGCTCCAGCTATGTGTGAAGAAGAGGACA GCACTGCCTTGGTGTGTGACAATGGCTCTGGGC TCTGTAAGGCCGGCTTTGCTGGGGACGATGCTC CCAGGGCTGTTTTCCCATCCATTGTGGGACGTC CCAGACATCAGGGGGTGATGGTGGGAATGGGA CAAAAAGACAGCTACGTGGGTGACGAAGCACA GAGCAAAAGAGGAATCCTGACCCTGAAGTACC CGATAGAACATGGCATCATCACCAACTGGGAC GACATGGAAAAGATCTGGCACCACTCTTTCTAC AATGAGCTTCGTGTTGCCCCTGAAGAGCATCCC ACCCTGCTCACGGAGGCACCCCTGAACCCCAAG GCCAACCGGGAGAAAATGACTCAAATTATGTTT GAGACTTTCAATGTCCCAGCCATGTATGTGGCT ATCCAGGCGGTGCTGTCTCTCTATGCCTCTGGA CGCACAACTGGCATCGTGCTGGACTCTGGAGAT GGTGTCACCCACAATGTCCCCATCTATGAGGGC TATGCCTTGCCCCATGCCATCATGCGTCTGGAT CTGGCTGGCCGAGATCTCACTGACTACCTCATG AAGATCCTGACTGAGCGTGGCTATTCCTTCGTT ACTACTGCTGAGCGTGAGATTGTCCGGGACATC AAGGAGAAACTGTGTTATGTAGCTCTGGACTTT GAAAATGAGATGGCCACTGCCGCATCCTCATCC

SEQ ID NO:	描述	序列
		TCCCTTGAGAAGAGTTACGAGTTGCCTGATGGG CAAGTGATCACCATCGGAAATGAACGTTTCCGC TGCCCAGAGACCCTGTTCCAGCCATCCTTCATC GGGATGGAGTCTGCTGGCATCCATGAAACCACC TACAACAGCATCATGAAGTGTGATATTGACATC AGGAAGGACCTCTATGCTAACAATGTCCTATCA GGGGGCACCACTATGTACCCTGGCATTGCCGAC CGAATGCAGAAGGAGATCACGGCCCTAGCACC CAGCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCCCTCC GGAGCGCAAATACTCTGTCTGGATCGGTGGCTC CATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTCCAGCAGAT GTGGATCAGCAAACAGGAATACGATGAAGCCG GGCCTTCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAAA ACACTTTCCTGCTCCTCTCTGTCTCTAGCACACA ACTGTGAATGTCCTGTGGAATTATGCCTTCAGT TCTTTTCCAAATCATTCCTAGCCAAAGCTCTGAC TCGTTACCTATGTGTTTTTTAATAAATCTGAAAT AGGCTACTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
71	人類MYOCD mRNA	AATCGCCGGCAGCCTATGACATCAGACAGGAA CGCCTGGGATGCCGCGCTGCTCCTGGCCAACCT CCGAGGAGGAGGAGGGTCCCGCCGGCTAAGAG TTAATTAGCCCCGCACGGCGAGGGGGGAGGCG CCAGTTTTCTGGGGACACTGGCTGCCACTGTAC TCCTACCCAGGGGAGCTCACGGAGAGTTGGATG AATTCTGGGTTGTTAGCTGCGGTCAGCTGGGCT CCCGGGAGCCTGTTGCTGGTGGAGAACAGGGG GCGCCTGGCCAAGGGACCAGCGGCTTGCTGAG ACTCAACATGACACTCCTGGGGTCTGAGCATTC CTTGCTGATTAGGAGCAAGTTCAGATCAGTTTT ACAGTTAAGACTTCAACAAAGAAGGACCCAGG AACAACTGGCTAACCAAGGCATAATACCACCA CTGAAACGTCCAGCTGAATTCCATGAGCAAAGA AAACATTTGGATAGTGACAAGGCTAAAAATTCC CTGAAGCGCAAAGCCAGAAACAGGTGCAACAG TGCCGACTTGGTTAATATGCACATACTCCAAGC TTCCACTGCAGAGAGGTCCATTCCAACTGCTCA GATGAAGCTGAAAAGAGCCCGACTCGCCGATG ATCTCAATGAAAAAATTGCTCTACGACCAGGGC CACTGGAGCTGGTGGAAAAAAACATTCTTCCTG TGGATTCTGCTGTGAAAGAGGCCATAAAAGGTA ACCAGGTGAGTTTCTCCAAATCCACGGATGCTT TTGCCTTTGAAGAGGACAGCAGCAGCGATGGG CTTTCTCCGGATCAGACTCGAAGTGAAGACCCC CAAAACTCAGCGGGATCCCCGCCAGACGCTAA AGCCTCAGATACCCCTTCGACAGGTTCTCTGGG GACAAACCAGGATCTTGCTTCTGGCTCAGAAAA TGACAGAAATGACTCAGCCTCACAGCCCAGCCA CCAGTCAGATGCGGGGAAGCAGGGGCTTGGCC

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCCCCAGCACCCCCATAGCCGTGCATGCTGCTG TAAAGTCCAAATCCTTGGGTGACAGTAAGAACC GCCACAAAAAGCCCAAGGACCCCAAGCCAAAG GTGAAGAAGCTTAAATATCACCAGTACATTCCC CCAGACCAGAAGGCAGAGAAGTCCCCTCCACC TATGGACTCAGCCTACGCTCGGCTGCTCCAGCA ACAGCAGCTGTTCCTGCAGCTCCAAATCCTCAG CCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACACCGATTCA GCTACCTAGGGATGCACCAAGCTCAGCTTAAGG AACCAAATGAACAGATGGTCAGAAATCCAAAC TCTTCTTCAACGCCACTGAGCAATACCCCCTTGT CTCCTGTCAAAAACAGTTTTTCTGGACAAACTG GTGTCTCTTCTTTCAAACCAGGCCCACTCCCACC TAACCTGGATGATCTGAAGGTCTCTGAATTAAG ACAACAGCTTCGAATTCGGGGCTTGCCTGTGTC AGGCACCAAAACGGCTCTCATGGACCGGCTTCG ACCCTTCCAGGACTGCTCTGGCAACCCAGTGCC GAACTTTGGGGATATAACGACTGTCACTTTTCC TGTCACACCCAACACGCTGCCCAATTACCAGTC TTCCTCTTCTACCAGTGCCCTGTCCAACGGCTTC TACCACTTTGGCAGCACCAGCTCCAGCCCCCCG ATCTCCCCAGCCTCCTCTGACCTGTCAGTCGCTG GGTCCCTGCCGGACACCTTCAATGATGCCTCCC CCTCCTTCGGCCTGCACCCGTCCCCAGTCCACG TGTGCACGGAGGAAAGTCTCATGAGCAGCCTG AATGGGGGCTCTGTTCCTTCTGAGCTGGATGGG CTGGACTCCGAGAAGGACAAGATGCTGGTGGA GAAGCAGAAGGTGATCAATGAACTCACCTGGA AACTCCAGCAAGAGCAGAGGCAGGTGGAGGAG CTGAGGATGCAGCTTCAGAAGCAGAAAAGGAA TAACTGTTCAGAGAAGAAGCCGCTGCCTTTCCT GGCTGCCTCCATCAAGCAGGAAGAGGCTGTCTC CAGCTGTCCTTTTGCATCCCAAGTACCTGTGAA AAGACAAAGCAGCAGCTCAGAGTGTCACCCAC CGGCTTGTGAAGCTGCTCAACTCCAGCCTCTTG GAAATGCTCATTGTGTGGAGTCCTCAGATCAAA CCAATGTACTTTCTTCCACATTTCTCAGCCCCCA GTGTTCCCCTCAGCATTCACCGCTGGGGGCTGT GAAAAGCCCACAGCACATCAGTTTGCCCCCATC ACCCAACAACCCTCACTTTCTGCCCTCATCCTCC GGGGCCCAGGGAGAAGGGCACAGGGTCTCCTC GCCCATCAGCAGCCAGGTGTGCACTGCACAGA ACTCAGGAGCACACGATGGCCATCCTCCAAGCT TCTCTCCCCATTCTTCCAGCCTCCACCCGCCCTT CTCTGGAGCCCAAGCAGACAGCAGTCATGGTGC CGGGGGAAACCCTTGTCCCAAAAGCCCATGTGT ACAGCAAAAGATGGCTGGTTTACACTCTTCTGA TAAGGTGGGGCCAAAGTTTTCAATTCCATCCCC AACTTTTTCTAAGTCAAGTTCAGCAATTTCAGA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GGTAACACAGCCTCCATCCTATGAAGATGCCGT AAAGCAGCAAATGACCCGGAGTCAGCAGATGG ATGAACTCCTGGACGTGCTTATTGAAAGCGGAG AAATGCCAGCAGACGCTAGAGAGGATCACTCA TGTCTTCAAAAAGTCCCAAAGATACCCAGATCT TCCCGAAGTCCAACTGCTGTCCTCACCAAGCCC TCGGCTTCCTTTGAACAAGCCTCTTCAGGCAGC CAGATCCCCTTTGATCCCTATGCCACCGACAGT GATGAGCATCTTGAAGTCTTATTAAATTCCCAG AGCCCCCTAGGAAAGATGAGTGATGTCACCCTT CTAAAAATTGGGAGCGAAGAGCCTCACTTTGAT GGGATAATGGATGGATTCTCTGGGAAGGCTGCA GAAGACCTCTTCAATGCACATGAGATCTTGCCA GGCCCCCTCTCTCCAATGCAGACACAGTTTTCA CCCTCTTCTGTGGACAGCAATGGGCTGCAGTTA AGCTTCACTGAATCTCCCTGGGAAACCATGGAG TGGCTGGACCTCACTCCGCCAAATTCCACACCA GGCTTTAGCGCCCTCACCACCAGCAGCCCCAGC ATCTTCAACATCGATTTCCTGGATGTCACTGATC TCAATTTGAATTCTTCCATGGACCTTCACTTGCA GCAGTGGTAGAATGCCCAATGCACCAGTGCTAT GGAAGACCAATGGAGTTCCATGGGGGAAAGCA CACAGCCATACATACTTTACTGTCCAAAAACAG AAGAAGAAGAAGAGAATTAAAAAGAAGCAATG ATTTCTGTGCCAATGAACAAGAACAAAAGTCAT TTTTAGAAATACATATACTGTAATATTTACCAA CAGTCAGTAACTGTTAATGATTTCAACAATGCA TTAAAAGAATGTGCTTTCTCAGATTAAGGATGC CAAAAAAGATATTTCACTGCCTTTTCAAAGACC AGTATATTTTCTAGCCCATAATTTTTCTCAGGCA TTGTTGGGGCATAAGCTCACACTGTAAGCTTTT CTCATGAATTCACTAGACATAACGTGGAAGGAA AACGTAGTCTTTTGGGAGTACAGGGAAGCCAGC CCCTCAAAGCTTATGGAAGACATACCTGCAATG GAAGCTGTTGCCCAATGTCTCCATTACTATCTTT CAAAAGAGAAGCCAGACCCAGCTTCAGATCAA AAGTTCTTGAGACAGAGGAACAAAACCAATCG ATTTCCAGGGAAGCTAATCAACTCTCTTTTCCCT CTACCACAAAACTGCCCTGCTGGAGTGGTTCTG AACCTGTACCCAGGACTCGATGTGGTCACTAAT AACAATTAACCTGAACTGAGTCCACAGAACTCC ACTCGGAACTTTCTTCTTTTTTAACTAGTGGCCC AATCATTCCCACCATCTCTGTGCTGATAAGTAC GTGTCCTAGATGAGAACCCTGAAGAATGCAGA CCTTCTTCCCCCGAAGGAGATGCCACAAGCTCT CCAACACAGCCCCCTTTAGTTCCAAAGACTAGA GATGACCACATTGGTAGAAGTATATCTCGAGGC ACAGGAAGGGAGCCCCACCAGGGATAATTCAG ACAGGACTAGAGAATAACATCATTTCACATACC

SEQ ID NO:	描述	序列
		CTGGGATAAACACCCTGGGTTCCTATAGAAGGA CTATTACTTATGGGAGTCCAACTTCTCCTTTTGT TTTGTTATTATCAGTTTATCTTTCTCCCACTCCA CTTTTCCTTCAAGGTACCAATCCTTTCCTGTTCC TCGTTTGGCCATCTTTCTTTTTCTGCCTCCACAT TGGGAGGGGAGGACTTCTCAGTTCTAACAAGCT GCCATACTCCTAAGAAAGCCATTTTTGAAAAAT TTAACAATCCAGGTTCTTCTGGAGAACTCATTC TCCACACGCACAGTTTGCTGCAAAAGGAAGTTG CAAGAATTTCTTGAGGAAGAAACTGGTGACTTG GTCCATCAGTCACGAAGTTCTTTCTATTCTCGTT TAGTTTTCAAGAAATTATTGGTTTGTGTTGCTCT GGGGAAATTGGAAATCATTACATTGTAAAGAC AAATATGGATGATATTTACAAGAGAGAATTTCA GATCTGGGTTTTTGAAAGAAAACAGAATTGCGC ATTGAAAACGATGGAAGGAAAAAGACAATGGT CTAATGTGCATTCCTCATTACCTCTCGTGGCTTT GGCTGGGAGTTGGAAAAAGCTAAAATTTCAGA ACAGTCTCTGTAAGGCTCTCTGTGGCTCCAGTT CACCATTTTATATTGTTGCATGCTGTAGAAAGG AGCTATTGCTGTTGTTTTGTTTTTTTATTTAAAT CACTAAGGCACTGTTTTTATCTTTTGTAAAAAA AAAAAAAAAAGTTGTTCACTGTGCACTTATAGAA AAAATAATCAAAAATGTTGGGATTTTAGAAGCT CTCTTTTTGATAAACCAAAGATTTAGAAGTCAT TCCATTGTTAACTTGTAAAAATGTGTGAACACA GAGAGTTTTTGGTGATTGCTACTCTGAAAGCTG CCAGATCTTATTCTGGGGGTGGGATGTGGAGGA ATACACATACACACACAAACATACATGTATGTA TAATAGATATATACATATGTGTATATTATATCT GTGTGTGCATGTATCTCCAAAAGCGGCGTTACA GAGTTCTACACCAAAAGCCTTTAACCCTTAATC TGCTGTGAATGATACCTGGCCTTTCTCACTATG AATTTCTGATTAACCAACCAGACTACACGTTGC CTCTCTGTGTATGACTAACGGCTCCAACCCGAT GACTCACAGCTACTTGCTTATCGTGAACAAGCT CATCTTGGCAATGAATATGGATGTGAAAAGACA GAACAGCTTCACCATTAGTAGCTGGAAATGGTA TCACAGTCTCTTATAGAGGAATATGAAAGGAAC AAGAAAATCATTTTACATTCCTTTTATCTGTATT GTGCTTTAAAAGATCCACATGGTAAATTTTTTA TTTTGCTTTTATGTCAGTCATCAGAACCAAAAA AATCCAGAAGAAAAAATTGCCAGTGTTTCCTTT GAAGATGAAGCTACTGGGGAAGAAAACCTTAT TAATACACTCCACACATTTGTTCATTCCTCAGCT GTTGGTGTTTTCTTGGGGTCTTGACAAAGCTTGC TGGTCAGTGCACTTTTCAGGTGTCACGTTTTGCT GTTTGTATGTTTTTTCTTCCCCTTACTTCCTTTGG AAAACAAACTCACACAGTGCCCCTACTCTGAGA

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCTGGGACTGAGTGTTAATTATTTTTTCCTTGGG TATTTCTATCTGAGAGACTAGACCTAGTTAGGA GGCCTCTGTACTTCTCCAGATTGTACCTTTTTAT GGGGATCTTTGAGGCTATGACCCAGGACTGATA GATATGCCTTACGGAAGACAAAAGATAAAATG GTTCCTATATCCTAATGCAAACCAACACAGTTA AAAGAGCAGATCTCTGGATAACTGCTCTCAACC TGCTTCTACAGTCTCCACAAACCGCATTCACCC TCTCTCTTCATAGCTCAGACATGAAATTTGAGG GAGAAAACTGGAGATAATTGGGAGAAAATTGA TGAAGTTGGCTGCTTCCAGTAGATCAGATAATC CATGAATTTGTCTCCCATTGAGAATTTTATTTTA AATTCTTTTAAACTCTTCGTTGTGTCTTTTGTGA TGACAAATCAGGCATGACTAAAAGATGTACAG AGACTTACGAAGATGGTCACATTCAAGTTCCCT AATGCTCTTAGAACCTGAAGATGACCATGTGTA GTTTTCTTAAGACCTCTGAACCCCCATGGTGAT GAAGACTTGAAGACATTTGCAGCTATCTGCTGC AGTCTGGTAGATTCATACTTATCTAAAGAAGTC AAAAAATTTATTCGTGCAAGTGCTTGCAGGAAG CCAGTGCTTATTAGTAGTGACCCTGCTTCTATCA ACGTTATTGAGACAACACATATTCTATTCTAAG GGAGAAAGAGGGAGGAAGAGAGGGAGGGAGG GAGGAAGAAGAGGGAGGGAGCGAGGAAGGAA GATAGGAGATGGGTAGGGGGGTAAAGAGAAAA GGAGGGAGAAGGGAAGGAAGGAAAGAAGAGA GGAAAGAAAGGAGGGAAGGAAAAAAGGGCCA AACTTTCTGATCTATGAACTTCTCAGTTCAGCTG TCACATTATGAGAAGTAAATCAGAATTTTTTTA AGGAGAAGTCATTCTTAGCACTACAATAATTGT ACCAGTAATTGAGGAAACCAAGACAATCTTCAC CTGAATAATAGAGGGTCTGAGAACTGTCAGCCT TTTGCCATTCAAAAACATTTATGTCCAACCTGA AAAAAAAGCATCAATAAAACCTATCCCAAGCA TTCAAAATAGTCCTTTCCAAATGTTATTTATTTT AAAGTCAATCAGCTCTTTTAGAAACAGATTCTG GTCTGGCTGAAAACTCCCACAACAAATTTACTC ATCCAGTGGCTAATATTTAATGCCCACCATGGG CAGAGCACACAAATCTTCAGATAAACAATACTG AATTGATTCAGCACAGATTGTTCAGATTTGAAT GACCAGGGAGTTGTATTTGCACATGCAAGAACA CTAAGAATCTCCCAGTCCTCAAACTAGAAACCT TTCAGCTACGATGAAAAAAAAAAAGGGGTCTT CATTTTTCCAAGAGGGGGTGGAGGTGGGGATCA CTTTTTAGCTAAAAGCTATCTCTCACTTCAAAAT TCTTGTCTTTTTCTTTGTGGACAAACACCAGTAG TCTATCACTTGGAGATCTTTTAATATCTCCCATC ATTTAAAACATCCACGAGAGTTTGAAGATTTGT GTTGATTGCCAGATACAGAAGCCCCTTGAAAAT

SEQ ID NO:	描述	序列
		AAGGAAAGGGTGGAGGAAGCATTTTTGTGTCCT ATCCCTACTTATCGTAGCAGCTCTATAGACAAA AGGGACACTTACTGGTGAGCCTCTGGCCCTTAA AAGAAAATCATCTAAGAATATGAAGGCAATTT GATTTCCCCCCACAGCCCTCAGCTGCCTTCCTC ACAGAAGGAAGTTCCCAAAATTGCTGGTACAC AGTTTGCAATCAAATATCAGATATGAGAAAACC TGTAGTGAAGAGTCTGGGTTCTTGGTTTTCTCAT AAATCCAATATAAATTTGTAGGTTGGTTCAGGG TCAAAATTGCCAGTGCTTTATTAGACAGATGAT ACTGATAGACACACAGAGCCCAGGTCCTGGAA CAAGACAATCCTGTAGTGCCAAGATCTGGTCAG TTGCGTTAAGGAGCTGGGTTTGATTCTAGAGTC CAGGTTTATAGAGAAACCCTGGCTAGATTGAGC CTACCCATGGGGAGACGATTTCAAGACAGGAT GAGATCTGGGAAGAATTTTGTTGTCATCTGCCA GGGAAATTATCACAGGACTCATTGAATGCAATA ACATGTGAGTAAGTTCCCTTTTGATTCTGGGAA TCAGCGATTTTCCCTGTGGATTAAGACAAACCA ACGCCAGAAGGTCTCCTGTGCTTATTTTAACCA TCTGCTCCCATCGTGAACCCTGGAGCATGCATT TCCTAGAAGTGGTTTCATAGCTCCTGTGTGTTCA TGGAAAAGGGGAGTATAATGATGGGGATGCTG GAAGCTTTTTTAATGTTTTCCAAAGGAAAGGAA CCCACACTGCTCCCCAGAGTTCCTTTCCAATGG CCCTGCAGTAAGAACGGAGGACAATGTATTGCT GGGTGCTTAAAATCCTCCCTCAGTGAAGCACAA AGAGACACTTTGTAAAGAAAAAAAGAGCAAGC ATAGGTTCTCTGTGGGACCTTGTGGAGTGGTGT TTTCACGTTGGTCTCTTTGGCTCAATTGAGCATA ATCAGAAAGAAATGTGGGTTATTGGGAAGAGA CAAAAAGCAGTGGCTAAAATACCAAAGTTGGC ATGTGTTCTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAATGCA TATATTTTTAAATAAAATGTTTATTTTAAAAAG AAAAAAAAAAAAAAAAAA
72	人類BSAP蛋白	MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQ ETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTV TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTY NTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAAT ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTR VNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDV EYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSHF IWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRN NVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRID HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSED TLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDT DKKPFTAILYGNGPGYKVVGGERENVSMVDYAH NNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLL

SEQ ID NO:	描述	序列
		HGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAG SLAAGPLLLALALYPLSVLF
73	人類BSAP mRNA	CCGGGCCTCACTCGGGCCCCGCGGCCGCCTTTA TAAGGCGGCGGGGGTGGTGGCCCGGGCCGCGT TGCGCTCCCGCCACTCCGCGCCCGCTATCCTGG CTCCGTGCTCCCACGCGCTTGTGCCTGGACGGA CCCTCGCCAGTGCTCTGCGCAGGATTGGAACAT CAGTTAACATCTGACCACTGCCAGCCCACCCCC TCCCACCCACGTCGATTGCATCTCTGGGCTCCA GGGATAAAGCAGGTCTTGGGGTGCACCATGATT TCACCATTCTTAGTACTGGCCATTGGCACCTGC CTTACTAACTCCTTAGTGCCAGAGAAAGAGAAA GACCCCAAGTACTGGCGAGACCAAGCGCAAGA GACACTGAAATATGCCCTGGAGCTTCAGAAGCT CAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTT CCTGGGAGATGGGATGGGTGTCTCCACAGTGAC GGCTGCCCGCATCCTCAAGGGTCAGCTCCACCA CAACCCTGGGGAGGAGACCAGGCTGGAGATGG ACAAGTTCCCCTTCGTGGCCCTCTCCAAGACGT ACAACACCAATGCCCAGGTCCCTGACAGCGCC GGCACCGCCACCGCCTACCTGTGTGGGGTGAAG GCCAATGAGGGCACCGTGGGGGTAAGCGCAGC CACTGAGCGTTCCCGGTGCAACACCACCCAGGG GAACGAGGTCACCTCCATCCTGCGCTGGGCCAA GGACGCTGGGAAATCTGTGGGCATTGTGACCAC CACGAGAGTGAACCATGCCACCCCCAGCGCCG CCTACGCCCACTCGGCTGACCGGGACTGGTACT CAGACAACGAGATGCCCCCTGAGGCCTTGAGCC AGGGCTGTAAGGACATCGCCTACCAGCTCATGC ATAACATCAGGGACATTGACGTGATCATGGGG GGTGGCCGGAAATACATGTACCCCAAGAATAA AACTGATGTGGAGTATGAGAGTGACGAGAAAG CCAGGGGCACGAGGCTGGACGGCCTGGACCTC GTTGACACCTGGAAGAGCTTCAAACCGAGATAC AAGCACTCCCACTTCATCTGGAACCGCACGGAA CTCCTGACCCTTGACCCCCACAATGTGGACTAC CTATTGGGTCTCTTCGAGCCAGGGGACATGCAG TACGAGCTGAACAGGAACAACGTGACGGACCC GTCACTCTCCGAGATGGTGGTGGTGGCCATCCA GATCCTGCGGAAGAACCCCAAAGGCTTCTTCTT GCTGGTGGAAGGAGGCAGAATTGACCACGGGC ACCATGAAGGAAAAGCCAAGCAGGCCCTGCAT GAGGCGGTGGAGATGGACCGGGCCATCGGGCA GGCAGGCAGCTTGACCTCCTCGGAAGACACTCT GACCGTGGTCACTGCGGACCATTCCCACGTCTT CACATTTGGTGGATACACCCCCCGTGGCAACTC TATCTTTGGTCTGGCCCCCATGCTGAGTGACAC AGACAAGAAGCCCTTCACTGCCATCCTGTATGG CAATGGGCCTGGCTACAAGGTGGTGGGCGGTG

SEQ ID NO:	描述	序列
		AACGAGAGAATGTCTCCATGGTGGACTATGCTC ACAACAACTACCAGGCGCAGTCTGCTGTGCCCC TGCGCCACGAGACCCACGGCGGGGAGGACGTG GCCGTCTTCTCCAAGGGCCCCATGGCGCACCTG CTGCACGGCGTCCACGAGCAGAACTACGTCCCC CACGTGATGGCGTATGCAGCCTGCATCGGGGCC AACCTCGGCCACTGTGCTCCTGCCAGCTCGGCA GGCAGCCTTGCTGCAGGCCCCCTGCTGCTCGCG CTGGCCCTCTACCCCCTGAGCGTCCTGTTCTGA GGGCCCAGGGCCCGGGCACCCACAAGCCCGTG ACAGATGCCAACTTCCCACACGGCAGCCCCCCC CTCAAGGGGCAGGGAGGTGGGGGCCTCCTCAG CCTCTGCAACTGCAAGAAAGGGGACCCAAGAA ACCAAAGTCTGCCGCCCACCTCGCTCCCCTCTG GAATCTTCCCCAAGGGCCAAACCCACTTCTGGC CTCCAGCCTTTGCTCCCTCCCCGCTGCCCTTTGG CCAACAGGGTAGATTTCTCTTGGGCAGGCAGAG AGTACAGACTGCAGACATTCTCAAAGCCTCTTA TTTTTCTAGCGAACGTATTTCTCCAGACCCAGA GGCCCTGAAGCCTCCGTGGAACATTCTGGATCT GACCCTCCCAGTCTCATCTCCTGACCCTCCCACT CCCATCTCCTTACCTCTGGAACCCCCCAGGCCC TACAATGCTCATGTCCCTGTCCCCAGGCCCAGC CCTCCTTCAGGGGAGTTGAGGTCTTTCTCCTCA GGACAAGGCCTTGCTCACTCACTCACTCCAAGA CCACCAGGGTCCCAGGAAGCCGGTGCCTGGGT GGCCATCCTACCCAGCGTGGCCCAGGCCGGGA AGAGCCACCTGGCAGGGCTCACACTCCTGGGCT CTGAACACACACGCCAGCTCCTCTCTGAAGCGA CTCTCCTGTTTGGAACGGCAAAAAAAAATTTTT TTTTCTCTTTTTGGTGGTGGTTAAAAGGGAACA CAAAACATTTAAATAAAACTTTCCAAATATTTC CGAGGACAAAAAAAAAAA
74	Snail mRNA	ATTCATTGCGCCGCGGCACGGCCTAGCGAGTGG TTCTTCTGCGCTACTGCTGCGCGAATCGGCGAC CCCAGTGCCTCGACCACTATGCCGCGCTCTTTC CTCGTCAGGAAGCCCTCCGACCCCAATCGGAAG CCTAACTACAGCGAGCTGCAGGACTCTAATCCA GAGTTTACCTTCCAGCAGCCCTACGACCAGGCC CACCTGCTGGCAGCCATCCCACCTCCGGAGATC CTCAACCCCACCGCCTCGCTGCCAATGCTCATC TGGGACTCTGTCCTGGCGCCCCAAGCCCAGCCA ATTGCCTGGGCCTCCCTTCGGCTCCAGGAGAGT CCCAGGGTGGCAGAGCTGACCTCCCTGTCAGAT GAGGACAGTGGGAAAGGCTCCCAGCCCCCCAG CCCACCCTCACCGGCTCCTTCGTCCTTCTCCTCT ACTTCAGTCTCTTCCTTGGAGGCCGAGGCCTAT GCTGCCTTCCCAGGCTTGGGCCAAGTGCCCAAG CAGCTGGCCCAGCTCTCTGAGGCCAAGGATCTC

SEQ ID NO:	描述	序列
		CAGGCTCGAAAGGCCTTCAACTGCAAATACTGC AACAAGGAATACCTCAGCCTGGGTGCCCTCAAG ATGCACATCCGAAGCCACACGCTGCCCTGCGTC TGCGGAACCTGCGGGAAGGCCTTCTCTAGGCCC TGGCTGCTACAAGGCCATGTCCGGACCCACACT GGCGAGAAGCCCTTCTCCTGTCCCCACTGCAGC CGTGCCTTCGCTGACCGCTCCAACCTGCGGGCC CACCTCCAGACCCACTCAGATGTCAAGAAGTAC CAGTGCCAGGCGTGTGCTCGGACCTTCTCCCGA ATGTCCCTGCTCCACAAGCACCAAGAGTCCGGC TGCTCAGGATGTCCCCGCTGACCCTCGAGGCTC CCTCTTCCTCTCCATACCTGCCCCTGCCTGACAG CCTTCCCCAGCTCCAGCAGGAAGGACCCCACAT CCTTCTCACTGCCATGGAATTCCCTCCTGAGTGC CCCACTTCTGGCCACATCAGCCCCACAGGACTT TGATGAAGACCATTTTCTGGTTCTGTGTCCTCTG CCTGGGCTCTGGAAGAGGCCTTCCCATGGCCAT TTCTGTGGAGGGAGGGCAGCTGGCCCCCAGCCC TGGGGGATTCCTGAGCTGGCCTGTCTGCGTGGG TTTTTGTATCCAGAGCTGTTTGGATACAGCTGCT TTGAGCTACAGGACAAAGGCTGACAGACTCACT GGGAAGCTCCCACCCCACTCAGGGGACCCCACT CCCCTCACACACACCCCCCCACAAGGAACCCTC AGGCCACCCTCCACGAGGTGTGACTAACTATGC AATAATCCACCCCCAGGTGCAGCCCCAGGGCCT GCGGAGGCGGTGGCAGACTAGAGTCTGAGATG CCCCGAGCCCAGGCAGCTATTTCAGCCTCCTGT TTGGTGGGGTGGCACCTGTTTCCCGGGCAATTT AACAATGTCTGAAAAGGGACTGTGAGTAATGG CTGTCACTTGTCGGGGGCCCAAGTGGGGTGCTC TGGTCTGACCGATGTGTCTCCCAGAACTATTCT GGGGGCCCGACAGGTGGGCCTGGGAGGAAGAT GTTTACATTTTTAAAGGTACACTGGTATTTATAT TTCAAACATTTTGTATCAAGGAAACGTTTTGTA TAGTTATATGTACAGTTTATTGATATTCAATAA AGCAGTTAATTTATATATTAAAAAAAAAAAAA AAAAA
75	Dkk1 mRNA	GCAGAGCTCTGTGCTCCCTGCAGTCAGGACTCT GGGACCGCAGGGGGCTCCCGGACCCTGACTCTG CAGCCGAACCGGCACGGTTTCGTGGGGACCCA GGCTTGCAAAGTGACGGTCATTTTCTCTTTCTTT CTCCCTCTTGAGTCCTTCTGAGATGATGGCTCTG GGCGCAGCGGGAGCTACCCGGGTCTTTGTCGCG ATGGTAGCGGCGGCTCTCGGCGGCCACCCTCTG CTGGGAGTGAGCGCCACCTTGAACTCGGTTCTC AATTCCAACGCTATCAAGAACCTGCCCCCACCG CTGGGCGGCGCTGCGGGGCACCCAGGCTCTGCA GTCAGCGCCGCGCCGGGAATCCTGTACCCGGGC GGGAATAAGTACCAGACCATTGACAACTACCA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCCGTACCCGTGCGCAGAGGACGAGGAGTGCG GCACTGATGAGTACTGCGCTAGTCCCACCCGCG GAGGGGACGCAGGCGTGCAAATCTGTCTCGCCT GCAGGAAGCGCCGAAAACGCTGCATGCGTCAC GCTATGTGCTGCCCCGGGAATTACTGCAAAAAT GGAATATGTGTGTCTTCTGATCAAAATCATTTC CGAGGAGAAATTGAGGAAACCATCACTGAAAG CTTTGGTAATGATCATAGCACCTTGGATGGGTA TTCCAGAAGAACCACCTTGTCTTCAAAAATGTA TCACACCAAAGGACAAGAAGGTTCTGTTTGTCT CCGGTCATCAGACTGTGCCTCAGGATTGTGTTG TGCTAGACACTTCTGGTCCAAGATCTGTAAACC TGTCCTGAAAGAAGGTCAAGTGTGTACCAAGCA TAGGAGAAAAGGCTCTCATGGACTAGAAATATT CCAGCGTTGTTACTGTGGAGAAGGTCTGTCTTG CCGGATACAGAAAGATCACCATCAAGCCAGTA ATTCTTCTAGGCTTCACACTTGTCAGAGACACT AAACCAGCTATCCAAATGCAGTGAACTCCTTTT ATATAATAGATGCTATGAAAACCTTTTATGACC TTCATCAACTCAATCCTAAGGATATACAAGTTC TGTGGTTTCAGTTAAGCATTCCAATAACACCTT CCAAAAACCTGGAGTGTAAGAGCTTTGTTTCTT TATGGAACTCCCCTGTGATTGCAGTAAATTACT GTATTGTAAATTCTCAGTGTGGCACTTACCTGT AAATGCAATGAAACTTTTAATTATTTTTCTAAA GGTGCTGCACTGCCTATTTTTCCTCTTGTTATGT AAATTTTTGTACACATTGATTGTTATCTTGACTG ACAAATATTCTATATTGAACTGAAGTAAATCAT TTCAGCTTATAGTTCTTAAAAGCATAACCCTTTA CCCCATTTAATTCTAGAGTCTAGAACGCAAGGA TCTCTTGGAATGACAAATGATAGGTACCTAAAA TGTAACATGAAAATACTAGCTTATTTTCTGAAA TGTACTATCTTAATGCTTAAATTATATTTCCCTT TAGGCTGTGATAGTTTTTGAAATAAAATTTAAC ATTTAATATCATGAAATGTTATAAGTAGACATA CATTTTGGGATTGTGATCTTAGAGGTTTGTGTGT GTGTACGTATGTGTGTGTTCTACAAGAACGGAA GTGTGATATGTTTAAAGATGATCAGAGAAAAG ACAGTGTCTAAATATAAGACAATATTGATCAGC TCTAGAATAACTTTAAAGAAAGACGTGTTCTGC ATTGATAAACTCAAATGATCATGGCAGAATGAG AGTGAATCTTACATTACTACTTTCAAAAATAGT TTCCAATAAATTAATAATACCTAAAAAAAAAAA
76	Col1a1 mRNA	TCGTCGGAGCAGACGGGAGTTTCTCCTCGGGGT CGGAGCAGGAGGCACGCGGAGTGTGAGGCCAC GCATGAGCGGACGCTAACCCCCTCCCCAGCCAC AAAGAGTCTACATGTCTAGGGTCTAGACATGTT CAGCTTTGTGGACCTCCGGCTCCTGCTCCTCTTA GCGGCCACCGCCCTCCTGACGCACGGCCAAGA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GGAAGGCCAAGTCGAGGGCCAAGACGAAGACA TCCCACCAATCACCTGCGTACAGAACGGCCTCA GGTACCATGACCGAGACGTGTGGAAACCCGAG CCCTGCCGGATCTGCGTCTGCGACAACGGCAAG GTGTTGTGCGATGACGTGATCTGTGACGAGACC AAGAACTGCCCCGGCGCCGAAGTCCCCGAGGG CGAGTGCTGTCCCGTCTGCCCCGACGGCTCAGA GTCACCCACCGACCAAGAAACCACCGGCGTCG AGGGACCCAAGGGAGACACTGGCCCCCGAGGC CCAAGGGGACCCGCAGGCCCCCCTGGCCGAGA TGGCATCCCTGGACAGCCTGGACTTCCCGGACC CCCCGGACCCCCCGGACCTCCCGGACCCCCTGG CCTCGGAGGAAACTTTGCTCCCCAGCTGTCTTA TGGCTATGATGAGAAATCAACCGGAGGAATTTC CGTGCCTGGCCCCATGGGTCCCTCTGGTCCTCG TGGTCTCCCTGGCCCCCCTGGTGCACCTGGTCC CCAAGGCTTCCAAGGTCCCCCTGGTGAGCCTGG CGAGCCTGGAGCTTCAGGTCCCATGGGTCCCCG AGGTCCCCCAGGTCCCCCTGGAAAGAATGGAG ATGATGGGGAAGCTGGAAAACCTGGTCGTCCTG GTGAGCGTGGGCCTCCTGGGCCTCAGGGTGCTC GAGGATTGCCCGGAACAGCTGGCCTCCCTGGAA TGAAGGGACACAGAGGTTTCAGTGGTTTGGATG GTGCCAAGGGAGATGCTGGTCCTGCTGGTCCTA AGGGTGAGCCTGGCAGCCCTGGTGAAAATGGA GCTCCTGGTCAGATGGGCCCCCGTGGCCTGCCT GGTGAGAGAGGTCGCCCTGGAGCCCCTGGCCCT GCTGGTGCTCGTGGAAATGATGGTGCTACTGGT GCTGCCGGGCCCCCTGGTCCCACCGGCCCCGCT GGTCCTCCTGGCTTCCCTGGTGCTGTTGGTGCTA AGGGTGAAGCTGGTCCCCAAGGGCCCCGAGGC TCTGAAGGTCCCCAGGGTGTGCGTGGTGAGCCT GGCCCCCCTGGCCCTGCTGGTGCTGCTGGCCCT GCTGGAAACCCTGGTGCTGATGGACAGCCTGGT GCTAAAGGTGCCAATGGTGCTCCTGGTATTGCT GGTGCTCCTGGCTTCCCTGGTGCCCGAGGCCCC TCTGGACCCCAGGGCCCCGGCGGCCCTCCTGGT CCCAAGGGTAACAGCGGTGAACCTGGTGCTCCT GGCAGCAAAGGAGACACTGGTGCTAAGGGAGA GCCTGGCCCTGTTGGTGTTCAAGGACCCCCTGG CCCTGCTGGAGAGGAAGGAAAGCGAGGAGCTC GAGGTGAACCCGGACCCACTGGCCTGCCCGGA CCCCCTGGCGAGCGTGGTGGACCTGGTAGCCGT GGTTTCCCTGGCGCAGATGGTGTTGCTGGTCCC AAGGGTCCCGCTGGTGAACGTGGTTCTCCTGGC CCTGCTGGCCCCAAAGGATCTCCTGGTGAAGCT GGTCGTCCCGGTGAAGCTGGTCTGCCTGGTGCC AAGGGTCTGACTGGAAGCCCTGGCAGCCCTGGT CCTGATGGCAAAACTGGCCCCCCTGGTCCCGCC

SEQ ID NO:	描述	序列
		GGTCAAGATGGTCGCCCCGGACCCCCAGGCCC ACCTGGTGCCCGTGGTCAGGCTGGTGTGATGGG ATTCCCTGGACCTAAAGGTGCTGCTGGAGAGCC CGGCAAGGCTGGAGAGCGAGGTGTTCCCGGAC CCCCTGGCGCTGTCGGTCCTGCTGGCAAAGATG GAGAGGCTGGAGCTCAGGGACCCCCTGGCCCT GCTGGTCCCGCTGGCGAGAGAGGTGAACAAGG CCCTGCTGGCTCCCCCGGATTCCAGGGTCTCCC TGGTCCTGCTGGTCCTCCAGGTGAAGCAGGCAA ACCTGGTGAACAGGGTGTTCCTGGAGACCTTGG CGCCCCTGGCCCCTCTGGAGCAAGAGGCGAGA GAGGTTTCCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTC CCCCTGGTCCTGCTGGTCCCCGAGGGGCCAACG GTGCTCCCGGCAACGATGGTGCTAAGGGTGATG CTGGTGCCCCTGGAGCTCCCGGTAGCCAGGGCG CCCCTGGCCTTCAGGGAATGCCTGGTGAACGTG GTGCAGCTGGTCTTCCAGGGCCTAAGGGTGACA GAGGTGATGCTGGTCCCAAAGGTGCTGATGGCT CTCCTGGCAAAGATGGCGTCCGTGGTCTGACTG GCCCCATTGGTCCTCCTGGCCCTGCTGGTGCCC CTGGTGACAAGGGTGAAAGTGGTCCCAGCGGC CCTGCTGGTCCCACTGGAGCTCGTGGTGCCCCC GGAGACCGTGGTGAGCCTGGTCCCCCCGGCCCT GCTGGCTTTGCTGGCCCCCCTGGTGCTGACGGC CAACCTGGTGCTAAAGGCGAACCTGGTGATGCT GGTGCTAAAGGCGATGCTGGTCCCCCTGGCCCT GCCGGACCCGCTGGACCCCCTGGCCCCATTGGT AATGTTGGTGCTCCTGGAGCCAAAGGTGCTCGC GGCAGCGCTGGTCCCCCTGGTGCTACTGGTTTC CCTGGTGCTGCTGGCCGAGTCGGTCCTCCTGGC CCCTCTGGAAATGCTGGACCCCCTGGCCCTCCT GGTCCTGCTGGCAAAGAAGGCGGCAAAGGTCC CCGTGGTGAGACTGGCCCTGCTGGACGTCCTGG TGAAGTTGGTCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCTGC TGGCGAGAAAGGATCCCCTGGTGCTGATGGTCC TGCTGGTGCTCCTGGTACTCCCGGGCCTCAAGG TATTGCTGGACAGCGTGGTGTGGTCGGCCTGCC TGGTCAGAGAGGAGAGAGAGGCTTCCCTGGTCT TCCTGGCCCCTCTGGTGAACCTGGCAAACAAGG TCCCTCTGGAGCAAGTGGTGAACGTGGTCCCCC TGGTCCCATGGGCCCCCCTGGATTGGCTGGACC CCCTGGTGAATCTGGACGTGAGGGGGCTCCTGG TGCCGAAGGTTCCCCTGGACGAGACGGTTCTCC TGGCGCCAAGGGTGACCGTGGTGAGACCGGCC CCGCTGGACCCCCTGGTGCTCCTGGTGCTCCTG GTGCCCCTGGCCCCGTTGGCCCTGCTGGCAAGA GTGGTGATCGTGGTGAGACTGGTCCTGCTGGTC CCGCCGGTCCTGTCGGCCCTGTTGGCGCCCGTG GCCCCGCCGGACCCCAAGGCCCCCGTGGTGAC

SEQ ID NO:	描述	序列
		AAGGGTGAGACAGGCGAACAGGGCGACAGAGG CATAAAGGGTCACCGTGGCTTCTCTGGCCTCCA GGGTCCCCCTGGCCCTCCTGGCTCTCCTGGTGA ACAAGGTCCCTCTGGAGCCTCTGGTCCTGCTGG TCCCCGAGGTCCCCCTGGCTCTGCTGGTGCTCCT GGCAAAGATGGACTCAACGGTCTCCCTGGCCCC ATTGGGCCCCCTGGTCCTCGCGGTCGCACTGGT GATGCTGGTCCTGTTGGTCCCCCCGGCCCTCCT GGACCTCCTGGTCCCCCTGGTCCTCCCAGCGCT GGTTTCGACTTCAGCTTCCTGCCCCAGCCACCTC AAGAGAAGGCTCACGATGGTGGCCGCTACTAC CGGGCTGATGATGCCAATGTGGTTCGTGACCGT GACCTCGAGGTGGACACCACCCTCAAGAGCCTG AGCCAGCAGATCGAGAACATCCGGAGCCCAGA GGGCAGCCGCAAGAACCCCGCCCGCACCTGCC GTGACCTCAAGATGTGCCACTCTGACTGGAAGA GTGGAGAGTACTGGATTGACCCCAACCAAGGCT GCAACCTGGATGCCATCAAAGTCTTCTGCAACA TGGAGACTGGTGAGACCTGCGTGTACCCCACTC AGCCCAGTGTGGCCCAGAAGAACTGGTACATC AGCAAGAACCCCAAGGACAAGAGGCATGTCTG GTTCGGCGAGAGCATGACCGATGGATTCCAGTT CGAGTATGGCGGCCAGGGCTCCGACCCTGCCGA TGTGGCCATCCAGCTGACCTTCCTGCGCCTGAT GTCCACCGAGGCCTCCCAGAACATCACCTACCA CTGCAAGAACAGCGTGGCCTACATGGACCAGC AGACTGGCAACCTCAAGAAGGCCCTGCTCCTCC AGGGCTCCAACGAGATCGAGATCCGCGCCGAG GGCAACAGCCGCTTCACCTACAGCGTCACTGTC GATGGCTGCACGAGTCACACCGGAGCCTGGGG CAAGACAGTGATTGAATACAAAACCACCAAGA CCTCCCGCCTGCCCATCATCGATGTGGCCCCCT TGGACGTTGGTGCCCCAGACCAGGAATTCGGCT TCGACGTTGGCCCTGTCTGCTTCCTGTAAACTCC CTCCATCCCAACCTGGCTCCCTCCCACCCAACC AACTTTCCCCCCAACCCGGAAACAGACAAGCA ACCCAAACTGAACCCCCTCAAAAGCCAAAAAA TGGGAGACAATTTCACATGGACTTTGGAAAATA TTTTTTTCCTTTGCATTCATCTCTCAAACTTAGTT TTTATCTTTGACCAACCGAACATGACCAAAAAC CAAAAGTGCATTCAACCTTACCAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAGAATAAATAAATAACTTTTTAAA AAAGGAAGCTTGGTCCACTTGCTTGAAGACCCA TGCGGGGGTAAGTCCCTTTCTGCCCGTTGGGCT TATGAAACCCCAATGCTGCCCTTTCTGCTCCTTT CTCCACACCCCCCTTGGGGCCTCCCCTCCACTC CTTCCCAAATCTGTCTCCCCAGAAGACACAGGA AACAATGTATTGTCTGCCCAGCAATCAAAGGCA ATGCTCAAACACCCAAGTGGCCCCCACCCTCAG

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCCGCTCCTGCCCGCCCAGCACCCCCAGGCCCT GGGGGACCTGGGGTTCTCAGACTGCCAAAGAA GCCTTGCCATCTGGCGCTCCCATGGCTCTTGCA ACATCTCCCCTTCGTTTTTGAGGGGGTCATGCC GGGGGAGCCACCAGCCCCTCACTGGGTTCGGA GGAGAGTCAGGAAGGGCCACGACAAAGCAGAA ACATCGGATTTGGGGAACGCGTGTCAATCCCTT GTGCCGCAGGGCTGGGCGGGAGAGACTGTTCT GTTCCTTGTGTAACTGTGTTGCTGAAAGACTAC CTCGTTCTTGTCTTGATGTGTCACCGGGGCAACT GCCTGGGGGCGGGGATGGGGGCAGGGTGGAAG CGGCTCCCCATTTTATACCAAAGGTGCTACATC TATGTGATGGGTGGGGTGGGGAGGGAATCACT GGTGCTATAGAAATTGAGATGCCCCCCCAGGCC AGCAAATGTTCCTTTTTGTTCAAAGTCTATTTTT ATTCCTTGATATTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTT GTGGATGGGGACTTGTGAATTTTTCTAAAGGTG CTATTTAACATGGGAGGAGAGCGTGTGCGGCTC CAGCCCAGCCCGCTGCTCACTTTCCACCCTCTCT CCACCTGCCTCTGGCTTCTCAGGCCTCTGCTCTC CGACCTCTCTCCTCTGAAACCCTCCTCCACAGC TGCAGCCCATCCTCCCGGCTCCCTCCTAGTCTGT CCTGCGTCCTCTGTCCCCGGGTTTCAGAGACAA CTTCCCAAAGCACAAAGCAGTTTTTCCCCCTAG GGGTGGGAGGAAGCAAAAGACTCTGTACCTAT TTTGTATGTGTATAATAATTTGAGATGTTTTTAA TTATTTTGATTGCTGGAATAAAGCATGTGGAAA TGACCCAAACATAA
77	活化素A mRNA	ATGCCCTTGCTTTGGCTGAGAGGATTTCTGTTG GCAAGTTGCTGGATTATAGTGAGGAGTTCCCCC ACCCCAGGATCCGAGGGGCACAGCGCGGCCCC CGACTGTCCGTCCTGTGCGCTGGCCGCCCTCCC AAAGGATGTACCCAACTCTCAGCCAGAGATGGT GGAGGCCGTCAAGAAGCACATTTTAAACATGCT GCACTTGAAGAAGAGACCCGATGTCACCCAGC CGGTACCCAAGGCGGCGCTTCTGAACGCGATCA GAAAGCTTCATGTGGGCAAAGTCGGGGAGAAC GGGTATGTGGAGATAGAGGATGACATTGGAAG GAGGGCAGAAATGAATGAACTTATGGAGCAGA CCTCGGAGATCATCACGTTTGCCGAGTCAGGTT GGTGCTGGCATTGGCAGGGGGTGGGGAGGGGT GGGGGGTGGGAGGGTAAAATATATTTCTTTGAC AGTCCCAGGAGGAACTTCTTTTCCCTTCAGCTG GAAACTGCCTGGGAAGGTTATTAGTTATTAGGT GATGGTAGCGGACTAGCCGACGGAGGGCAGGC AGGGGAGGGGGAGAGGACTTTACAGAAAAGGA ATTCTCGGTCGAGCTCTGCCTGGAGATGACTGG CTTACACTTACTAAACCCAGCGGGTCACACAGA GAGGAAGCTCGGGGCCAATGTTGAGCTGGAAG

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCAGACTGTGAGGGGCTGCCTTGCCCTGCCTGT GAAACAGATCTGAGCAGCCGGAGGAAAGCCGC GGCATTTTCGGGTGCTAGGGGAGCAGAGGAGG CTTCCGGACCCCATCCAAGTTTTTATTGAGGGT AGAGGGGTGAATGTACCAGGATTGGAGTGGAA TGGCACAGATGAAGTCACTCTCTTAAAACAAAC CTTCCCCTTTAAAAGTCCAATCTGGGGCCACAT TGGAGAAGCAGGGCATATTTATGAGTGACAGTC ATTTTTACCTTTAGAAAATGTCTATAAGTGCAC AGGCACCACATTCAAGACAGGGAAGAGCTACT TTGGGGGACAGTTGTCATTGAACCAGCAGTTAC TTTTGGGACACTGACTTTTGCTCTCTGAAAGAA AAAAAAATAAATAAAACAACCAGTTTTGTTCTT TCTAAAGTTACTAAGAGCTCTCTGCCAAGGAAC GAACCTTGACAAAGTACTCTCAGATACTACGCT GAAGTCACTCAATCTTAAGAGGAAGAAG
78	Snai1引子1	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA
79	Snai1引子2	AGATGAGCATTGGCAGCGAG
80	Dkk1引子1	CCTTGAACTCGGTTCTCAATTCC
81	Dkk1引子2	CAATGGTCTGGTACTTATTCCCG
82	Col1a1引子1	GAGGGCCAAGACGAAGACATC
83	Col1a1引子2	CAGATCACGTCATCGCACAAC
84	活化素引子1	TCATCACGTTTGCCGAGTCA
85	活化素引子2	GCTAGTCCGCTACCATCACC
86	人類Axin2 mRNA	ACTGGCTCCGCGAGCCTGGCCCGGGGGAGTCG GCTGGAGCCGGCTGCGCTTTGATAAGGTCCTGG CAACTCAGTAACAGCCCGAGAGCCGGGAAATA AAAATAACCCCTCAGAGCGATGGATTTCGGGGC CGCCCGGCGGCCGAGGCGCCCGCCGAAGGCCC TGCTGTAAAAGAGAGGAGGTTCAGATGAGCCC CTGCTGACTTGAGAGAGACAGAGAGACCACGC CGATTGCTGAGAGGAACTGGAAGAAGAAAAAT TCCCAGACTCAGTGGGAAGAGCTCCCTCACCAT GAGTAGCGCTATGTTGGTGACTTGCCTCCCGGA CCCCAGCAGCAGCTTCCGTGAGGATGCCCCGCG GCCCCCAGTGCCAGGGGAAGAAGGGGAGACCC CACCGTGTCAGCCAGGGGTGGGCAAGGGCCAG GTCACCAAACCCATGCCTGTCTCTTCCAACACC AGGCGGAACGAAGATGGGTTGGGGGAGCCGGA GGGGCGGGCATCTCCGGATTCCCCTCTGACCCG GTGGACCAAGTCCTTACACTCCTTATTGGGCGA TCAAGACGGTGCTTACCTGTTCCGAACTTTCCT GGAGAGGGAGAAATGCGTGGATACCTTAGACT TCTGGTTTGCCTGCAATGGATTCAGGCAGATGA ACCTGAAGGATACCAAAACTTTACGAGTAGCCA AAGCGATCTACAAAAGGTACATTGAGAACAAC AGCATTGTCTCCAAGCAGCTGAAGCCTGCCACC AAGACCTACATAAGAGATGGCATCAAGAAGCA

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCAGATTGATTCCATCATGTTTGACCAGGCGCA GACCGAGATCCAGTCGGTGATGGAGGAAAATG CCTACCAGATGTTTTTGACTTCTGATATATACCT CGAATATGTGAGGAGTGGGGGAGAAAACACAG CTTACATGAGTAATGGGGGACTCGGGAGCCTAA AGGTCGTGTGTGGCTATCTCCCCACCTTGAATG AAGAAGAGGAGTGGACTTGTGCCGACTTCAAG TGCAAACTTTCGCCAACCGTGGTTGGCTTGTCC AGCAAAACTCTGAGGGCCACGGCGAGTGTGAG GTCCACGGAAACTGTTGACAGTGGATACAGGTC CTTCAAGAGGAGCGATCCTGTTAATCCTTATCA CATAGGTTCTGGCTATGTCTTTGCACCAGCCAC CAGCGCCAACGACAGTGAGATATCCAGTGATG CGCTGACGGATGATTCCATGTCCATGACGGACA GCAGTGTAGATGGAATTCCTCCTTATCGTGTGG GCAGTAAGAAACAGCTCCAGAGAGAAATGCAT CGCAGTGTGAAGGCCAATGGCCAAGTGTCTCTA CCTCATTTCCCGAGAACCCACCGCCTGCCCAAG GAGATGACCCCCGTGGAACCCGCCACCTTTGCA GCTGAGCTGATCTCGAGGCTGGAAAAGCTGAA GCTGGAGTTGGAGAGCCGCCACAGCCTGGAGG AGCGCCTGCAGCAGATCCGAGAGGATGAAGAG AGAGAGGGCTCCGAGCTCACACTCAATTCGCGG GAGGGGGCGCCCACGCAGCACCCCCTCTCCCTA CTGCCCTCCGGCAGCTACGAGGAAGACCCGCA GACGATACTGGACGATCACCTGTCCAGGGTCCT CAAGACCCCTGGCTGCCAGTCTCCAGGCGTAGG CCGCTATAGCCCCCGCTCCCGCTCCCCGGACCA CCACCACCACCACCATTCGCAGTACCACTCCCT GCTCCCGCCCGGTGGCAAGCTGCCTCCCGCGGC CGCCTCGCCGGGCGCCTGCCCCCTCCTCGGGGG CAAAGGCTTTGTGACCAAGCAGACGACGAAGC ATGTCCACCACCACTACATCCACCACCATGCCG TCCCCAAGACCAAGGAGGAGATCGAGGCGGAG GCCACGCAGCGGGTGCACTGCTTCTGCCCTGGG GGCAGCGAGTATTACTGCTACTCGAAATGCAAA AGCCACTCCAAGGCTCCGGAAACCATGCCCAG CGAGCAGTTTGGCGGCAGCAGAGGCAGTACCTT GCCCAAACGCAATGGGAAAGGCACGGAGCCGG GCCTGGCCCTGCCCGCCAGGGAAGGAGGGGCC CCCGGCGGAGCTGGGGCCCTGCAGCTTCCCCGG GAGGAAGGAGACAGGTCGCAGGATGTCTGGCA GTGGATGCTGGAGAGTGAGCGGCAGAGCAAGC CCAAGCCCCATAGTGCCCAAAGCACAAAAAAG GCCTACCCCTTGGAGTCTGCCCGCTCGTCTCCA GGCGAACGAGCCAGCCGGCACCATCTGTGGGG GGGCAACAGCGGGCACCCCCGCACCACCCCCC GTGCCCACCTGTTCACCCAGGACCCTGCGATGC CTCCCCTGACCCCACCCAACACGCTGGCTCAGC

SEQ ID NO:	描述	序列
		TGGAGGAGGCCTGTCGCAGGCTAGCTGAGGTGT CGAAGCCCCCAAAGCAGCGGTGCTGTGTGGCC AGTCAGCAGAGGGACAGGAATCATTCGGCCAC TGTTCAGACGGGAGCCACACCCTTCTCCAATCC AAGCCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGAGCCAA AGAAACTGGCAGGTGTCCACGCGCTCCAGGCC AGTGAGTTGGTTGTCACTTACTTTTTCTGTGGGG AAGAAATTCCATACCGGAGGATGCTGAAGGCT CAGAGCTTGACCCTGGGCCACTTTAAAGAGCAG CTCAGCAAAAAGGGAAATTATAGGTATTACTTC AAAAAAGCAAGCGATGAGTTTGCCTGTGGAGC GGTGTTTGAGGAGATCTGGGAGGATGAGACGG TGCTCCCGATGTATGAAGGCCGGATTCTGGGCA AAGTGGAGCGGATCGATTGAGCCCTGGGGTCTG GCTTTGGTGAACTGTTGGAGCCCGAAGCTCTTG TGAACTGTCTTGGCTGTGAGCAACTGCGACAAA ACATTTTGAAGGAAAATTAAACCAATGAAGAA GACAAAGTCTAAGGAAGAATCGGCCAGTGGGC CTTCGGGAGGGCGGGGGGAGGTTGATTTTCATG ATTCATGAGCTGGGTACTGACTGAGATAAGAAA AGCCTGAACTATTTATTAAAAACATGACCACTC TTGGCTATTGAAGATGCTGCCTGTATTTGAGAG ACTGCCATACATAATATATGACTTCCTAGGGAT CTGAAATCCATAAACTAAGAGAAACTGTGTATA GCTTACCTGAACAGGAATCCTTACTGATATTTA TAGAACAGTTGATTTCCCCCATCCCCAGTTTAT GGATATGCTGCTTTAAACTTGGAAGGGGGAGAC AGGAAGTTTTAATTGTTCTGACTAAACTTAGGA GTTGAGCTAGGAGTGCGTTCATGGTTTCTTCAC TAACAGAGGAATTATGCTTTGCACTACGTCCCT CCAAGTGAAGACAGACTGTTTTAGACAGACTTT TTAAAATGGTGCCCTACCATTGACACATGCAGA AATTGGTGCGTTTTGTTTTTTTTTTCCTATGCTG CTCTGTTTTGTCTTAAAGGTCTTGAGGGTTGACC ATGTTGCGTCATCATCAACATTTTGGGGGTTGT GTTGGATGGGATGATCTGTTGCAGAGGGAGAG GCAGGGAACCCTGCTCCTTCGGGCCCCAGGTTG ATCCTGTGACTGAGGCTCCCCCTCATGTAGCCT CCCCAGGCCCAGGGCCCTGAGGCCTGCTAGAAT CACTGCCGCTGTGCTTTCGTGGAAATGACAGTT CCTTGTTTTTTTTGTTTCTGTTTTTGTTTTACATT AGTCATTGGACCACAGCCATTCAGGAACTACCC CCTGCCCCACAAAGAAATGAACAGTTGTAGGG AGACCCAGCAGCACCTTTCCTCCACACACCTTC ATTTTGATGTTCGGGTTTTTGTGTTAAGTTAATC TGTACATTCTGTTTGCCATTGTTACTTGTACTAT ACATCTGTATATAGTGTACGGCAAAAGAGTATT AATCCACTATCTCTAGTGCTTGACTTTAAATCA GTACAGTACCTGTACCTGCACGGTCACCCGCTC

SEQ ID NO:	描述	序列
		CGTGTGTCGCCCTATATTGAGGGCTCAAGCTTT CCCTTGTTTTTTGAAAGGGGTTTATGTATAAATA TATTTTATGCCTTTTTATTACAAGTCTTGTACTC AATGACTTTTGTCATGACATTTTGTTCTACTTAT ACTGTAAATTATGCATTATAAAGAGTTCATTTA AGGAAAATTACTTGGTACAATAATTATTGTAAT TAAGAGATGTAGCCTTTATTAAAATTTTATATTT TTCAAAAAAAAAAA
87	人類Axin2胺基酸序列	MSSAMLVTCLPDPSSSFREDAPRPPVPGEEGETPP CQPGVGKGQVTKPMPVSSNTRRNEDGLGEPEGR ASPDSPLTRWTKSLHSLLGDQDGAYLFRTFLERE KCVDTLDFWFACNGFRQMNLKDTKTLRVAKAIY KRYIENNSIVSKQLKPATKTYIRDGIKKQQIDSIMF DQAQTEIQSVMEENAYQMFLTSDIYLEYVRSGGE NTAYMSNGGLGSLKVVCGYLPTLNEEEEWTCAD FKCKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETVDSGYRS FKRSDPVNPYHIGSGYVFAPATSANDSEISSDALT DDSMSMTDSSVDGIPPYRVGSKKQLQREMHRSV KANGQVSLPHFPRTHRLPKEMTPVEPATFAAELIS RLEKLKLELESRHSLEERLQQIREDEEREGSELTLN SREGAPTQHPLSLLPSGSYEEDPQTILDDHLSRVL KTPGCQSPGVGRYSPRSRSPDHHHHHHSQYHSLL PPGGKLPPAAASPGACPLLGGKGFVTKQTTKHVH HHYIHHHAVPKTKEEIEAEATQRVHCFCPGGSEY YCYSKCKSHSKAPETMPSEQFGGSRGSTLPKRNG KGTEPGLALPAREGGAPGGAGALQLPREEGDRSQ DVWQWMLESERQSKPKPHSAQSTKKAYPLESAR SSPGERASRHHLWGGNSGHPRTTPRAHLFTQDPA MPPLTPPNTLAQLEEACRRLAEVSKPPKQRCCVA SQQRDRNHSATVQTGATPFSNPSLAPEDHKEPKK LAGVHALQASELVVTYFFCGEEIPYRRMLKAQSL TLGHFKEQLSKKGNYRYYFKKASDEFACGAVFEE IWEDETVLPMYEGRILGKVERID

4.等效物

儘管本發明參考其特定實施例詳細描述，應瞭解功能上等效之變化在本發明之範疇內。當然，除本文中所顯示及描述之彼等外，對熟習此項技術者而言，本發明之各種修改將自先前描述及隨附圖式而變得顯而易見。該等修改意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇內。僅僅使用常規實驗，熟習此項技術者將認識到或能夠確定本文所描述之本發明之特定實施例的多個等效物。該等等效物欲由隨附申請專利範圍所涵蓋。

本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案在本文中以引用之方式併入本說明書中，程度如同各個別公開案、專利或專利申請案專門且單獨地指示為以全文引用之方式併入本文中一般。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商西建公司
美國華盛頓大學

<120> 使用ACTRII配位體捕捉以治療心血管疾病

<130> 12827-934-228

<150> 62/062,021
<151> 2014-10-09

<150> 62/078,321
<151> 2014-11-11

<150> 62/103,515
<151> 2015-01-14

<150> 62/167,052
<151> 2015-05-27

<150> 62/170,015
<151> 2015-06-02

<160> 87

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 513
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類ActRIIA前驅體多肽

<400> 1

```
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 Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
145                 150                 155                 160

Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu
            180                 185                 190

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

Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln
    210                 215                 220

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

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

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

Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
        275                 280                 285
```

```
Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
    290                 295                 300

Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
305                 310                 315                 320

Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
                325                 330                 335

Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
            340                 345                 350

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

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

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

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

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

Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
        435                 440                 445

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

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

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
                485                 490                 495
```

Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
500 505 510

Leu

<210> 2
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類ActRIIA可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 2

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
115

<210> 3
<211> 100
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIA可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 3

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
100

<210> 4
<211> 1542
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 編碼人類ActRIIA前驅蛋白之核酸序列

<400> 4
atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct
60

atacttggta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac
120

agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt
180

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaaacaagg ttgttggctg
240

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta
300

tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg
360

gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg
420

ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg
480

tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca
540

cccccacctt ctccattact agggttgaaa ccactgcagt tattagaagt gaaagcaagg
600

ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata
660

tttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg aagtctacag tttgcctgga
720

atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat
780

gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag
840

gctaatgtgg tctcttggaa tgaactgtgt catattgcag aaaccatggc tagaggattg
900

gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac
960

agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac
1020

tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataccca tggacaggtt
1080

ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt cgaaagggat
1140

gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc
1200

tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc
1260

cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt
1320

ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa
1380

tgttgggatc acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc
1440

cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg
1500

gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga
1542

<210> 5
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 編碼人類ActRIIA可溶(細胞外)多肽之核酸序列

<400> 5
atacttggta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac
60

agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt
120

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaaacaagg ttgttggctg
180

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta
240

tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg
300

gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacccc
345

<210> 6
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含融合至Fc結構域之ActRIIA之可溶細胞外結構域的融合蛋白

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(44)
<223> Xaa = Asp或Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (102)..(102)
<223> Xaa = Lys或Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (215)..(215)
<223> Xaa = 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 Asp Xaa Val Ser His Glu
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys
225
```

<210> 7
<211> 344
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合至人類Fc結構域之人類ActRIIA之細胞外結構域

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蜜蜂蜂毒肽(HBML)之前導序列

<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> 人工序列

<220>
<223> 組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)之前導序列

<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> 20
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 天然ActRIIA前導序列

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala
20

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ActRIIA-hFc及mActRIIA-Fc N端序列

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu
1 5

<210> 12
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ActRIIA之細胞外結構域之C端15個胺基酸刪除之ActRIIA-Fc蛋白

<400> 12

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 Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    130                 135                 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205

Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225                 230                 235                 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            260                 265                 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
```

275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 13
<211> 369
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有TPA前導序列之未經處理ActRIIA-hFc

<400> 13

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 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr
20 25 30

Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn
35 40 45

Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His
50 55 60

Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys
65 70 75 80

Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys
85 90 95

Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
100 105 110

Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr

```
        115                 120                 125

Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly
    130                 135                 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 14
<211> 1113
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼具有TPA前導序列之未經處理ActRIIA-hFc的核酸序列

<400> 14
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt
60

tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta
120

attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata
180

aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca
240

aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaaga
300

cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta
360

ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccacccac
420

cggtggtgga actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc
480

agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt
540

cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt
600

ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac
660

gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta
720

caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctccaaagc
780

caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac
840

caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt
900

ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga
960

ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca
1020

ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa
1080

gagcctctcc ctgtctccgg taaatgagaa ttc
1113

<210> 15
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端4個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-130)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 15

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
100 105

<210> 16
<211> 512
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類ActRIIB前驅蛋白序列(A64)

<400> 16

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 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> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸19-134)

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Pro Thr
115

<210> 18
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸19-119)

<400> 18

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

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

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

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

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

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

His Leu Pro Glu Ala
100

<210> 19
<211> 1539
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 編碼人類ActRIIB (A64)前驅蛋白之核酸序列

<400> 19
atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg
60

cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcatc tactacaacg ccaactggga gctggagcgc
120

accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac
180

gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat
240

gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac
300

ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatttgcc agaggctggg
360

ggcccggaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc
420

tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac
480

cggcatcgca agccccccta cggtcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca
540

ccatcccctc tggtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc
600

tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca
660

ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtgaa cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag
720

cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag
780

ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac
840

atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac
900

ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg
960

gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt
1020

ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acacccacgg acaggtaggc
1080

acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc
1140

ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc
1200

aaggctgcag acggacccgt ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag
1260

caccettcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt
1320

aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gcccagcttt gtgtgaccat cgaggagtgc
1380

tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg
1440

attcggaggt cggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc
1500

accaatgtgg acctgccccc taaagagtca agcatctaa
1539

<210> 20
<211> 344
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含融合至Fc結構域之ActRIIB (A64；SEQ ID NO:17)之可溶細胞外結構域的融合蛋白

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340
```

<210> 21
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含融合至Fc結構域之其中C端15個胺基酸刪除之ActRIIB (A64) (SEQ ID NO:18)之可溶細胞外結構域的融合蛋白

<400> 21

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

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

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

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

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

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

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    130                 135                 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205
```

```
Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225                 230                 235                 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            260                 265                 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        275                 280                 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    290                 295                 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305                 310                 315                 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 22
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端5個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-129)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 22

```
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
100 105

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-131)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 23

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> 24
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-131)且具有L79D突變且具有TPA前導序列之未經處理ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 24

```
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 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

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> 25
<211> 335
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:28之胺基酸25-131)且具有L79D突變之經處理ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 25

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 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 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> 26
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)

<400> 26

```
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> 27
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-119)

<400> 27

```
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> 28
<211> 512
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類ActRIIB前驅蛋白序列(A64)

<400> 28

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> 29

<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸19-134)

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Pro Thr
115

<210> 30
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸19-119)

<400> 30

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

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

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

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

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

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

His Leu Pro Glu Ala
            100
```

<210> 31
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-134)

<400> 31

```
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> 32
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端15個胺基酸刪除之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-119)

<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 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> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:16之胺基酸25-131)且具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 33

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 Ala 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> 34
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC結構域之N端6個胺基酸刪除且EC結構域之C端3個胺基酸刪除(SEQ ID NO:16之胺基酸25-131)且具有L79D突變且具有TPA前導序列之未經處理ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 34

```
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

Ala 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 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

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> 35
<211> 335
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EC 結構域之 N 端 6 個胺基酸刪除且 EC 結構域之 C 端 3 個胺基酸刪除(SEQ ID NO: 16 之胺基酸 25-131)且具有 L79D 突變之經處理 ActRIIB-Fc 融合蛋白

<400> 35

```
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 Ala 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 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 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> 36
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-134)

<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 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> 37
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)

<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 Ala 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> 38
<211> 343
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有融合至具有GGG連接子之Fc結構域的L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-134)

<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 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 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 Ala 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> 39
<211> 343
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有融合至Fc結構域的L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)

<400> 39

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 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 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 Ala 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> 40
<211> 368
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有融合至Fc結構域的L79D突變且具有TPA前導序列之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:28之胺基酸20-134)

<400> 40

```
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> 41
<211> 368
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有融合至Fc結構域的L79D突變且具有TPA前導序列之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列(SEQ ID NO:16之胺基酸20-134)

<400> 41

```
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 Ala 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> 42
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有變異C端序列(揭示於WO2007/053775中)之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 42

```
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> 43
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有變異C端序列(揭示於WO2007/053775中)，具有L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 43

```
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> 44
<211> 370
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有變異C端序列(揭示於WO2007/053775中)，具有融合至具有TGGG連接子之Fc結構域的L79D突變之人類ActRIIB可溶(細胞外)經處理多肽序列

<400> 44

```
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 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> 45
<211> 1083
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼SEQ ID NO:24之核酸序列

<400> 45
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt
60

tcgcccggcg ccgccgaaac ccgcgaatgt atttattaca atgctaattg ggaactcgaa
120

cggacgaacc aatccgggct cgaacggtgt gaggggggaac aggataaacg cctccattgc
180

tatgcgtcgt ggaggaactc ctccgggacg attgaactgg tcaagaaagg gtgctgggac
240

gacgatttca attgttatga ccgccaggaa tgtgtcgcga ccgaagagaa tccgcaggtc
300

tatttctgtt gttgcgaggg gaatttctgt aatgaacggt ttacccacct ccccgaagcc
360

ggcgggcccg aggtgaccta tgaacccccg cccaccggtg gtggaactca cacatgccca
420

ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc
480

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc
540

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc
600

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc
660

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc
720

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
780

gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
840

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
900

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctat
960

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg
1020

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa
1080

tga
1083

<210> 46
<211> 344
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含融合至Fc結構域之ActRIIB (R64；SEQ ID NO:29)之可溶細胞外結構域的融合蛋白

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
```

225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 47
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含融合至Fc結構域的其中C端15個胺基酸刪除之ActRIIB (R64) (SEQ ID NO:30)之可溶細胞外結構域的融合蛋白

<400> 47

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

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

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

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

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

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

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    130                 135                 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205

Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225                 230                 235                 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
```

260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Runx2 qRT-PCR引子1

<400> 48
ccgcacgaca accgcaccat
20

<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Runx2 qRT-PCR引子2

<400> 49
cgctccggcc cacaaatctc
20

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Alp qRT-PCR引子1

<400> 50

acgtggctaa gaatgtcatc
20

<210> 51
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Alp qRT-PCR引子2

<400> 51
ctggtaggcg atgtcctta
19

<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 奥斯特里克斯qRT-PCR引子1

<400> 52
tagtggtttg gggtttgttt accgc
25

<210> 53
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 奥斯特里克斯qRT-PCR引子2

<400> 53
aaccaaataa ctcttattcc ctaagt
26

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 克羅索qRT-PCR引子1

<400> 54
gctctcaaag cccacatact g
21

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 克羅索qRT-PCR引子1

<400> 55
gcagcataac gatagaggcc
20

<210> 56
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Sm22-α qRT-PCR引子1

<400> 56
gttccagact gttgacctct tt
22

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Sm22-α qRT-PCR引子2

<400> 57
ctgcgctttc ttcataaacc
20

<210> 58
<211> 5553
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類Runx2 mRNA

<400> 58
gtgtgaatgc ttcattcgcc tcacaaacaa ccacagaacc acaagtgcgg tgcaaacttt
60

ctccaggagg acagcaagaa gtctctggtt tttaaatggt taatctccgc aggtcactac
120

cagccaccga gaccaacaga gtcatttaag gctgcaagca gtatttacaa cagagggtac
180

aagttctatc tgaaaaaaaa aggagggact atggcatcaa acagcctctt cagcacagtg
240

acaccatgtc agcaaaactt cttttgggat ccgagcacca gccggcgctt cagcccccc
300

tccagcagcc tgcagcccgg caaaatgagc gacgtgagcc cggtggtggc tgcgcaacag
360

cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcagcagc agcaacagca gcagcagcag
420

caggaggcgg cggcggcggc tgcggcggcg gcggcggctg cggcggcggc agctgcagtg
480

ccccggttgc ggccgcccca cgacaaccgc accatggtgg agatcatcgc cgaccacccg
540

gccgaactcg tccgcaccga cagccccaac ttcctgtgct cggtgctgcc ctcgcactgg
600

cgctgcaaca agaccctgcc cgtggccttc aaggtggtag ccctcggaga ggtaccagat
660

gggactgtgg ttactgtcat ggcgggtaac gatgaaaatt attctgctga gctccggaat
720

gcctctgctg ttatgaaaaa ccaagtagca aggttcaacg atctgagatt tgtgggccgg
780

agtggacgag gcaagagttt caccttgacc ataaccgtct tcacaaatcc tccccaagta
840

gctacctatc acagagcaat taaagttaca gtagatggac ctcgggaacc cagaaggcac
900

agacagaagc ttgatgactc taaacctagt ttgttctctg accgcctcag tgatttaggg
960

cgcattcctc atcccagtat gagagtaggt gtcccgcctc agaacccacg gccctccctg
1020

aactctgcac caagtccttt taatccacaa ggacagagtc agattacaga ccccaggcag
1080

gcacagtctt ccccgccgtg gtcctatgac cagtcttacc cctcctacct gagccagatg
1140

acgtccccgt ccatccactc taccaccccg ctgtcttcca cacggggcac tgggcttcct
1200

gccatcaccg atgtgcctag gcgcatttca gatgatgaca ctgccacctc tgacttctgc
1260

ctctggcctt ccactctcag taagaagagc caggcaggtg cttcagaact gggccctttt
1320

tcagacccca ggcagttccc aagcatttca tccctcactg agagccgctt ctccaaccca
1380

cgaatgcact atccagccac ctttacttac accccgccag tcacctcagg catgtccctc
1440

ggtatgtccg ccaccactca ctaccacacc tacctgccac caccctaccc cggctcttcc
1500

caaagccaga gtggaccctt ccagaccagc agcactccat atctctacta tggcacttcg
1560

tcaggatcct atcagtttcc catggtgccg gggggagacc ggtctccttc cagaatgctt
1620

ccgccatgca ccaccacctc gaatggcagc acgctattaa atccaaattt gcctaaccag
1680

aatgatggtg ttgacgctga tggaagccac agcagttccc caactgtttt gaattctagt
1740

ggcagaatgg atgaatctgt ttggcgacca tattgaaatt cctcagcagt ggcccagtgg
1800

tatctggggg ccacatccca cacgtatcaa tatatacata tatagagaga gtgcatatat
1860

atgtatatcg attagctatc tacaaagtgc ctatttttta gaagattttt cattcactca
1920

ctcagtcatg atcttgcagc cataagaggg tagatattga gaagcagaag gctcaagaga
1980

gacaattgca atcgagcttc agattgttta ctatttaaga tgtactttta caaaggaaca
2040

aagaagggaa aaggtatttt tgtttttgtt gtttggtctg ttatcatcaa taacctgttc
2100

atatgccaat tcagagaggt ggactccagg ttcaggaggg agaagagcaa agccgcttcc
2160

tctctgtgct ttgaaacttc acaccctcac ggtggcagct gtgtatggac cagtgccctc
2220

cgcagacagc tcacaaaacc agttgaggtg cactaaaggg acatgaggta gaatggatgc
2280

ttccatcaca gtaccatcat tcagaataac tcttccaatt tctgctttca gacatgctgc
2340

aggtcctcat ctgaactgtt gggttcgttt ttttttttt ttttcctgct ccaagaaagt
2400

gacttcaaaa ataactgatc aggatagatt attttatttt acttttaac actccttctc
2460

ccctttccc actgaaccaa aaagaaatcc catccctaaa acctgccttc tcctttatg
2520

caaaactgaa aatggcaata cattattata gccataatgg tatagatagt gattgcgttt
2580

ggctatgtgt tgttttcttt ttttttaaat tatgaatatg tgtaaaatct gaggtaactt
2640

gctaacgtga atggtcatat aactttaaag atatatttat aattatttaa tgacatttgg
2700

acccttgaaa catttcttag tgtattgata tgttgacttc ggtctctaaa agtgctcttt
2760

attaaataac aaatttcttc agtggtctag agccatatct gaaatattgc taagcaattt
2820

cagttcatcc aggcacaatg tgattttaaa aaatacttcc atctccaaat attttagata
2880

tagattgttt ttgtgatgta tgaaggaaat gttatgttta gttctttcag atctttgaat
2940

gcctctaaca cagctttgcc ttctaaagcg gtaattaggg atttaaaaaa caacctttag
3000

ccctttatca gcatgaaatg ctggagtgat gtggttttct aatttctttg gggtaattat
3060

gactcttgtc atattaaaaa gacaagcaca agtaaatcat tgaactacag aaaaatgttc
3120

tgtggtttca tagttaagca aaactctaaa tcgccaggct tcatagcaaa gacatagtca
3180

gctaaaagcc gcacatgtgg atagagggtt caattatgag acacctagta caggagagca
3240

aaattgcacc agagattctt aaccaaccag ccttaccaaa caacacaaca ggggaacccc
3300

aatctgcctt acccaaggcc ccactggcag ctttccacag aatttgcatt tagaggagca
3360

gaatgacatc actgtccttt gggagtaggt cctctgaaaa ggcagcaggt tccagcaggt
3420

agctgagctg agaggacata tggcccacgg ggacctacag acagcctttg acatttgtat
3480

ttcttacaat ggagggccaa ggagggcaag gggctgtgga gtttggtgtc tactagtgtg
3540

tatgaatttg agctagagtc cttctgtggc atgcactttg accactcctg gcagtcacat
3600

ggcagatttc caagtgcaaa tccttaatcc aaacaaggat catctaatga caccaccagg
3660

ccaatccctg ctctcctccc cgaaaagtca gggtcccttc attggaatcc tccacccacc
3720

caagcagaat ttagcagaga tttgccttca aaccctaacg gccccttgt tctctggtcc
3780

ttctcaaacc cacctttgta ggccacccag cattgcagga cagcgtgtgg ggcagctgga
3840

cctgtgcttc ctgcctggga gtctcccttg gaattcatcc tgactccttc taataaaaat
3900

ggatgggaaa gcaaaacact ttgccttcta aaggccgtat accaagtatg cttagataaa
3960

taagccactt ttctattact taagtaagaa ggaagtagta attgatacta tttattgttt
4020

gtgtgtggta gcttgaagca caccactgtc catttatttg taagtgtaaa atatgtgtgt
4080

ttgtttcagc agcacttaaa aaagccagtg tctggttaca catttcaatt ttaattaatt
4140

gacataaaaa tgctaccgcc agtgccagct gcatcctatt taattaaaaa ggtactatat
4200

ttgtacatta ttttttaatg ttaaaagggc ttttttaagt ttacagtaca cataccgagt
4260

gactttaggg atgcttttgt gttgaaatgt tactatagtg gctgcaggca gcaacccaga
4320

aacactttag aagctttttt tccttgggaa aaattcaagc acttcttccc tccaccctca
4380

ctccaaccac cccaatgggg gtaattcaca tttcttagaa caaattctgc ccttttttgg
4440

tctagggatt aaaattttgt ttttctttct ttctttttt ttttttttca ctgaaccctt
4500

aatttgcact gggtcatgtg tttgatttgt gatttcaaga ccaaagcaaa gtcttactac
4560

tactgtggaa ccatgtacta gttcctggga attaaaatag cgtggttctc tttgtagcac
4620

aaacattgct ggaatttgca gtcttttcaa tgcagccaca tttttatcca tttcagttgt
4680

ctcacaaatt ttaacccata tcagagttcc agaacaggta ccacagcttt ggttttagat
4740

tagtggaata acattcagcc cagaactgag aaactcaaca gattaactat cgtttgctct
4800

ttagacggtc tcactgcctc tcacttgcca gagccctttc aaaatgagca gagaagtcca
4860

caccattagg gaccatctgt gataaattca gaagggagga gatgtgtgta cagctttaag
4920

gattccctca attccgagga aagggactgg cccagaatcc aggttaatac atggaaacac
4980

gaagcattag caaaagtaat aattatacct atggtatttg aaagaacaat aataaaagac
5040

acttcttcca aaccttgaat ttgttgtttt tagaaaacga atgcatttaa aaatattttc
5100

tatgtgagaa ttttttagat gtgtgtttac ttcatgttta caaataactg tttgcttttt
5160

aatgcagtac tttgaaatat atcagccaaa accataactt acaataattt cttaggtatt
5220

ctgaataaaa ttccatttct tttggatatg ctttaccatt cttaggtttc tgtggaacaa
5280

aaatatttgt agcattttgt gtaaatacaa gctttcattt ttatttttc caattgctat
5340

tgcccaagaa ttgctttcca tgcacatatt gtaaaaattc cgctttgtgc cacaggtcat
5400

gattgtggat gagtttactc ttaacttcaa agggactatt tgtattgtat gttgcaactg
5460

taaattgaat tatttggcat ttttctcatg attgtaatat taatttgaag tttgaattta
5520

attttcaata aaatggcttt tttggttttg tta
5553

<210> 59
<211> 3173
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類Alp mRNA

<400> 59
cggcgggcgg cagcagccta ggcagcagca gtagcagaag cagcagccgc cgagcagcag
60

caaggactct ggagtcagag taggactgta ggaccggagc ctgagtggaa caggagtgga
120

gctggcctgg gagagagcgg atccctccca gcaccctcag gccacccgtt gcctgcactc
180

tccctgccag acctccagag aggagagact cgggacagcc agccccaggt tcccccagct
240

ctctccatct gcctggctcc ttgggacccg ttccccagcc tcaggatggc gtcctccctg
300

cttgaggagg aagttcacta tggctccagt cccctggcca tgctgacggc agcgtgcagc
360

aaatttggtg gctctagccc tctgcgggac tcaacaactc tgggcaaagc aggcacaaag
420

aagccgtact ctgtgggcag tgacctttca gcctccaaaa ccatggggga tgcttatcca
480

gcccccttta caagcactaa tgggctcctt tcacctgcag gcagtcctcc agcacccacc
540

tcaggctatg ctaatgatta ccctcccttt tcccactcat tccctgggcc cacaggcacc
600

caggaccctg ggctactagt gcccaagggg cacagctctt ctgactgtct gcccagtgtc
660

tacacctctc tggacatgac acacccctat ggctcctggt acaaggcagg catccatgca
720

ggcatttcac caggcccagg caacactcct actccatggt gggatatgca ccctggaggc
780

aactggctag gtggtgggca gggccagggt gatgggctgc aagggacact gcccacaggt
840

ccagctcagc ctccactgaa cccccagctg cccacctacc catctgactt tgctcccctt
900

aatccagccc cctacccagc tccccacctc ttgcaaccag ggccccagca tgtcttgccc
960

caagatgtct ataaacccaa ggcagtggga aatagtgggc agctagaagg gagtggtgga
1020

gccaaacccc cacggggtgc aagcactggg ggtagtggtg gatatggggg cagtggggca
1080

gggcgctcct cctgcgactg ccctaattgc caggagctag agcggctggg agcagcagcg
1140

gctgggctgc ggaagaagcc catccacagc tgccacatcc ctggctgcgg caaggtgtat
1200

ggcaaggctt cgcacctgaa ggcccacttg cgctggcaca caggcgagag gcccttcgtc
1260

tgcaactggc tcttctgcgg caagaggttc actcgttcgg atgagctgga gcgtcatgtg
1320

cgcactcaca cccgggagaa gaagttcacc tgcctgctct gctccaagcg ctttacccga
1380

agcgaccacc tgagcaaaca ccagcgcacc catggagaac caggcccggg tccccctccc
1440

agtggcccca aggagctggg ggagggccgc agcacggggg aagaggaggc cagtcagacg
1500

ccccgacctt ctgcctcgcc agcaacccca gagaaagccc ctggaggcag ccctgagcag
1560

agcaacttgc tggagatctg agccgggtgg aaggtctccc accccagggc tgccctgaca
1620

gtctctcttg gctctctaga ccactgcttg ccaatcactc tctttacccc atgcatgcca
1680

tccttcgggg ctctctccct ctgtctccct cctggccatt ctgggcttgg gtatctcctt
1740

gcatgcctcc tcagctcacc ttctctcttc accatgagac tggctttcca caaactctca
1800

tctcaggccc tccccttgtg cctgatacct gcactccggc ttcctagact ctggccctgc
1860

cacaccaaca cactttctat ttgggctccc aacactattt ctccatctca ctccttgaca
1920

tgtacccctt tctgcttctc aagcttattt cctgctgtcc ctcagcctcc aggcttcagt
1980

cttcccaact tcttacacca ttgctttcca ttctccagaa ctctttttc ctttttacaa
2040

acacaatgat aatgataatt tattgccccc tggtggcctc ttcatcaggg gtattggggt
2100

tagtgacctg gccagagggt gccaagaggg gggcagacca gtggggatct gatcccaaag
2160

atggggtgac cccagggtca gggaggctgc ccccaggcct gtatatttaa cccctatgta
2220

ccaggagtaa tgaatagtaa taattctatt tatgtaagtt atgatgacgg gtcaggtaga
2280

gtgagctggg gagggaagtg gatccatttc tgctaaggaa attctagtca aatgcatctc
2340

tgtatagaca aaatgttagt ggagaagatc ttgttaatag aatgtctatc atcagaatct
2400

cagttgatag ggtttctctt gtaatgaagt ctctacaaat tgggttagct acatctctgc
2460

taaacagttg atggggtatc tcttgattag ggggatccct aatatcccca gccccagcca
2520

gaagctgtga aacctcaagt cctatggagg ggagaaggac tggaatgtac cccatctccc
2580

ttgactgcag agcaggttcc tccactgccc caccccttag acaccatgac cccatcaggt
2640

taatcccctg ttgccatggt tatggagagc ttgcagctgc catcttagat gtgctctttg
2700

gggaagccca tctaacagga ggacattggt ttgggggtgc acctcctgaa gaatgggtgg
2760

ggaaggcttt ctctaggatc agattcaaat aagtatgtat tgagtgccta ctctgtgcaa
2820

ggcactatgc tagatctggt gcctagaagc cctgagaaag aacttaaaga gctaggagga
2880

cagaggcccc caagctgatc tggtggtgca tccacgcacc cccaccctgg gactttggat
2940

gctcccatct ccacctccag tgacttttaa agccgcttcg tgcctttcct gtaacgttgg
3000

atcctccttt tctgtcccct gctgtctcaa ggccccaagt taaagggtta aagccgctgg
3060

agcttgggga gagaacattg tggaatggaa gggatcatgc cctttgtgga gtctttttt
3120

tttaatttaa taaataaaag ttggatttga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
3173

<210> 60
<211> 3173
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類奧斯特里克斯mRNA

<400> 60
cggcgggcgg cagcagccta ggcagcagca gtagcagaag cagcagccgc cgagcagcag
60

caaggactct ggagtcagag taggactgta ggaccggagc ctgagtggaa caggagtgga
120

gctggcctgg gagagagcgg atccctccca gcaccctcag gccacccgtt gcctgcactc
180

tccctgccag acctccagag aggagagact cgggacagcc agccccaggt tcccccagct
240

ctctccatct gcctggctcc ttgggacccg ttccccagcc tcaggatggc gtcctccctg
300

cttgaggagg aagttcacta tggctccagt cccctggcca tgctgacggc agcgtgcagc
360

aaatttggtg gctctagccc tctgcgggac tcaacaactc tgggcaaagc aggcacaaag
420

aagccgtact ctgtgggcag tgacctttca gcctccaaaa ccatggggga tgcttatcca
480

gcccccttta caagcactaa tgggctcctt tcacctgcag gcagtcctcc agcacccacc
540

tcaggctatg ctaatgatta ccctcccttt tcccactcat tccctgggcc cacaggcacc
600

caggaccctg ggctactagt gcccaagggg cacagctctt ctgactgtct gcccagtgtc
660

tacacctctc tggacatgac acacccctat ggctcctggt acaaggcagg catccatgca
720

ggcatttcac caggcccagg caacactcct actccatggt gggatatgca ccctggaggc
780

aactggctag gtggtgggca gggccagggt gatgggctgc aagggacact gcccacaggt
840

ccagctcagc ctccactgaa cccccagctg cccacctacc catctgactt tgctcccctt
900

aatccagccc cctacccagc tccccacctc ttgcaaccag ggccccagca tgtcttgccc
960

caagatgtct ataaacccaa ggcagtggga aatagtgggc agctagaagg gagtggtgga
1020

gccaaacccc cacggggtgc aagcactggg ggtagtggtg gatatggggg cagtggggca
1080

gggcgctcct cctgcgactg ccctaattgc caggagctag agcggctggg agcagcagcg
1140

gctgggctgc ggaagaagcc catccacagc tgccacatcc ctggctgcgg caaggtgtat
1200

ggcaaggctt cgcacctgaa ggcccacttg cgctggcaca caggcgagag gcccttcgtc
1260

tgcaactggc tcttctgcgg caagaggttc actcgttcgg atgagctgga gcgtcatgtg
1320

cgcactcaca cccgggagaa gaagttcacc tgcctgctct gctccaagcg ctttacccga
1380

agcgaccacc tgagcaaaca ccagcgcacc catggagaac caggcccggg tccccctccc
1440

agtggcccca aggagctggg ggagggccgc agcacggggg aagaggaggc cagtcagacg
1500

ccccgacctt ctgcctcgcc agcaacccca gagaaagccc ctggaggcag ccctgagcag
1560

agcaacttgc tggagatctg agccgggtgg aaggtctccc accccagggc tgccctgaca
1620

gtctctcttg gctctctaga ccactgcttg ccaatcactc tctttacccc atgcatgcca
1680

tccttcgggg ctctctccct ctgtctccct cctggccatt ctgggcttgg gtatctcctt
1740

gcatgcctcc tcagctcacc ttctctcttc accatgagac tggctttcca caaactctca
1800

tctcaggccc tccccttgtg cctgatacct gcactccggc ttcctagact ctggccctgc
1860

cacaccaaca cactttctat ttgggctccc aacactattt ctccatctca ctccttgaca
1920

tgtacccctt tctgcttctc aagcttattt cctgctgtcc ctcagcctcc aggcttcagt
1980

cttcccaact tcttacacca ttgctttcca ttctccagaa ctctttttc ctttttacaa
2040

acacaatgat aatgataatt tattgccccc tggtggcctc ttcatcaggg gtattggggt
2100

tagtgacctg gccagagggt gccaagaggg gggcagacca gtggggatct gatcccaaag
2160

atggggtgac cccagggtca gggaggctgc ccccaggcct gtatatttaa cccctatgta
2220

ccaggagtaa tgaatagtaa taattctatt tatgtaagtt atgatgacgg gtcaggtaga
2280

gtgagctggg gagggaagtg gatccatttc tgctaaggaa attctagtca aatgcatctc
2340

tgtatagaca aaatgttagt ggagaagatc ttgttaatag aatgtctatc atcagaatct
2400

cagttgatag ggtttctctt gtaatgaagt ctctacaaat tgggttagct acatctctgc
2460

taaacagttg atggggtatc tcttgattag ggggatccct aatatcccca gccccagcca
2520

gaagctgtga aacctcaagt cctatggagg ggagaaggac tggaatgtac cccatctccc
2580

ttgactgcag agcaggttcc tccactgccc caccccttag acaccatgac cccatcaggt
2640

taatcccctg ttgccatggt tatggagagc ttgcagctgc catcttagat gtgctctttg
2700

gggaagccca tctaacagga ggacattggt ttgggggtgc acctcctgaa gaatgggtgg
2760

ggaaggcttt ctctaggatc agattcaaat aagtatgtat tgagtgccta ctctgtgcaa
2820

ggcactatgc tagatctggt gcctagaagc cctgagaaag aacttaaaga gctaggagga
2880

cagaggcccc caagctgatc tggtggtgca tccacgcacc cccaccctgg gactttggat
2940

gctcccatct ccacctccag tgacttttaa agccgcttcg tgcctttcct gtaacgttgg
3000

atcctccttt tctgtcccct gctgtctcaa ggccccaagt taaagggtta aagccgctgg
3060

agcttgggga gagaacattg tggaatggaa gggatcatgc cctttgtgga gtctttttt
3120

tttaatttaa taaataaaag ttggatttga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
3173

<210> 61
<211> 5003
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類克羅索mRNA

<400> 61
cgcgcagcat gcccgccagc gccccgccgc gccgcccgcg gccgccgccg ccgtcgctgt
60

cgctgctgct ggtgctgctg ggcctgggcg gccgccgcct gcgtgcggag ccgggcgacg
120

gcgcgcagac ctgggcccgt gtctcgcggc ctcctgcccc cgaggccgcg ggcctcttcc
180

agggcacctt ccccgacggc ttcctctggg ccgtgggcag cgccgcctac cagaccgagg
240

gcggctggca gcagcacggc aagggtgcgt ccatctggga cacgttcacc caccaccccc
300

tggcaccccc gggagactcc cggaacgcca gtctgccgtt gggcgccccg tcgccgctgc
360

agcccgccac cggggacgta gccagcgaca gctacaacaa cgtcttccgc gacacggagg
420

cgctgcgcga gctcggggtc actcactacc gcttctccat ctcgtgggcg cgagtgctcc
480

ccaatggcag cgcgggcgtc cccaaccgcg aggggctgcg ctactaccgg cgcctgctgg
540

agcggctgcg ggagctgggc gtgcagcccg tggtcaccct gtaccactgg gacctgcccc
600

agcgcctgca ggacgcctac ggcggctggg ccaaccgcgc cctggccgac cacttcaggg
660

attacgcgga gctctgcttc cgccacttcg gcggtcaggt caagtactgg atcaccatcg
720

acaaccccta cgtggtggcc tggcacggct acgccaccgg gcgcctggcc cccggcatcc
780

ggggcagccc gcggctcggg tacctggtgg cgcacaacct cctcctggct catgccaaag
840

tctggcatct ctacaatact tctttccgtc ccactcaggg aggtcaggtg tccattgccc
900

taagctctca ctggatcaat cctcgaagaa tgaccgacca cagcatcaaa gaatgtcaaa
960

aatctctgga ctttgtacta ggttggtttg ccaaacccgt atttattgat ggtgactatc
1020

ccgagagcat gaagaataac ctttcatcta ttctgcctga ttttactgaa tctgagaaaa
1080

agttcatcaa aggaactgct gacttttttg ctctttgctt tggacccacc ttgagtttc
1140

aacttttgga ccctcacatg aagttccgcc aattggaatc tcccaacctg aggcaactgc
1200

tttcctggat tgaccttgaa tttaaccatc ctcaaatatt tattgtggaa aatggctggt
1260

ttgtctcagg gaccaccaag agagatgatg ccaaatatat gtattacctc aaaaagttca
1320

tcatggaaac cttaaaagcc atcaagctgg atggggtgga tgtcatcggg tataccgcat
1380

ggtccctcat ggatggtttc gagtggcaca gaggttacag catcaggcgt ggactcttct
1440

atgttgactt tctaagccag gacaagatgt tgttgccaaa gtcttcagcc ttgttctacc
1500

aaaagctgat agagaaaaat ggcttccctc ctttacctga aaatcagccc ctagaaggga
1560

catttccctg tgactttgct tggggagttg ttgacaacta cattcaagta gataccactc
1620

tgtctcagtt taccgacctg aatgtttacc tgtgggatgt ccaccacagt aaaaggctta
1680

ttaaagtgga tggggttgtg accaagaaga ggaaatccta ctgtgttgac tttgctgcca
1740

tccagcccca gatcgcttta ctccaggaaa tgcacgttac acattttcgc ttctccctgg
1800

actgggccct gattctccct ctgggtaacc agtcccaggt gaaccacacc atcctgcagt
1860

actatcgctg catggccagc gagcttgtcc gtgtcaacat caccccagtg gtggccctgt
1920

ggcagcctat ggccccgaac caaggactgc cgcgcctcct ggccaggcag ggcgcctggg
1980

agaaccccta cactgccctg gcctttgcag agtatgcccg actgtgcttt caagagctcg
2040

gccatcacgt caagctttgg ataacgatga atgagccgta tacaaggaat atgacataca
2100

gtgctggcca caaccttctg aaggcccatg ccctggcttg gcatgtgtac aatgaaaagt
2160

ttaggcatgc tcagaatggg aaaatatcca tagccttgca ggctgattgg atagaacctg
2220

cctgcccttt ctcccaaaag gacaaagagg tggccgagag agttttggaa tttgacattg
2280

gctggctggc tgagcccatt ttcggctctg gagattatcc atgggtgatg agggactggc
2340

tgaaccaaag aaacaatttt cttcttcctt atttcactga agatgaaaaa aagctaatcc
2400

agggtacctt tgacttttg gctttaagcc attataccac catccttgta gactcagaaa
2460

aagaagatcc aataaaatac aatgattacc tagaagtgca agaaatgacc gacatcacgt
2520

ggctcaactc ccccagtcag gtggcggtag tgccctgggg gttgcgcaaa gtgctgaact
2580

ggctgaagtt caagtacgga gacctcccca tgtacataat atccaacgga atcgatgacg
2640

ggctgcatgc tgaggacgac cagctgaggg tgtattatat gcagaattac ataaacgaag
2700

ctctcaaagc ccacatactg gatggtatca atctttgcgg atactttgct tattcgttta
2760

acgaccgcac agctccgagg tttggcctct atcgttatgc tgcagatcag tttgagccca
2820

aggcatccat gaaacattac aggaaaatta ttgacagcaa tggtttcccg ggcccagaaa
2880

ctctggaaag attttgtcca gaagaattca ccgtgtgtac tgagtgcagt ttttttcaca
2940

cccgaaagtc tttactggct ttcatagctt ttctattttt tgcttctatt atttctctct
3000

cccttatatt ttactactcg aagaaaggca gaagaagtta caaatagttc tgaacatttt
3060

tctattcatt cattttgaaa taattatgca gacacatcag ctgttaacca tttgcacctc
3120

taagtgttgt gaaactgtaa atttcataca tttgacttct agaaaacatt tttgtggctt
3180

atgacagagg ttttgaaatg ggcataggtg atcgtaaaat attgaataat gcgaatagtg
3240

cctgaatttg ttctcttttt gggtgattaa aaaactgaca ggcactataa tttctgtaac
3300

acactaacaa aagcatgaaa aataggaacc acaccaatgc aacatttgtg cagaaatttg
3360

aatgacaaga ttaggaatat tttcttctgc acccacttct aaatttaatg tttttctgga
3420

agtagtaatt gcaagagttc gaatagaaag ttatgtacca agtaaccatt tctcagctgc
3480

cataataatg cctagtggct tcccctctgt caaatctagt ttcctatgga aaagaagatg
3540

gcagatacag gagagacgac agagggtcct aggctggaat gttcctttcg aaagcaatgc
3600

ttctatcaaa tactagtatt aatttatgta tctggttaat gacatacttg gagagcaaat
3660

tatggaaatg tgtattttat atgatttttg aggtcctgtc taaaccctgt gtccctgagg
3720

gatctgtctc actggcatct tgttgagggc cttgcacata ggaaactttt gataagtatc
3780

tgcggaaaaa caaacatgaa tcctgtgata ttgggctctt caggaagcat aaagcaattg
3840

tgaaatacag tataccgcag tggctctagg tggaggaaag gaggaaaaag tgcttattat
3900

gtgcaacatt atgattaatc tgattataca ccatttttga gcagatcttg gaatgaatga
3960

catgaccttt ccctagagaa taaggatgaa ataatcactc attctatgaa cagtgacact
4020

actttctatt ctttagctgt actgtaattt ctttgagttg atagttttac aaattcttaa
4080

taggttcaaa agcaatctgg tctgaataac actggatttg tttctgtgat ctctgaggtc
4140

tattttatgt ttttgctgct acttctgtgg aagtagcttt gaactagttt tactttgaac
4200

tttcacgctg aaacatgcta gtgatatcta gaaagggcta attaggtctc atcctttaat
4260

gcccccttaaa taagtcttgc tgattttcag acagggaagt ctctctatta cactggagct
4320

gttttataga taagtcaata ttgtatcagg caagataaac caatgtcata acaggcattg
4380

ccaacctcac tgacacaggg tcatagtgta taataatata ctgtactata taatatatca
4440

tctttagagg tatgattttt tcatgaaaga taagcttttg gtaatattca ttttaaagtg
4500

gacttattaa aattggatgc tagagaatca agtttatttt atgtatatat ttttctgatt
4560

ataagagtaa tatatgttca ttgtaaaaat ttttaaaaca cagaaactat atgcaaagaa
4620

aaaataaaaa ttatctataa tctcagaacc cagaaatagc cactattaac atttcctacg
4680

tattttattt tacatagatc atattgtata tagttagtat ctttattaat ttttattatg
4740

aaactttcct ttgtcattat tagtcttcaa aagcatgatt tttaatagtt gttgagtatt
4800

ccaccacagg aatgtatcac aacttaaccg ttcccgtttg ttagactagt ttcttattaa
4860

tgttgatgaa tgttgtttaa aaataatttt gttgctacat ttactttaat ttccttgact
4920

gtaaagagaa gtaattttgc tccttgataa agtattatat taataataaa tctgcctgca
4980

acttttttgcc ttctttcata atc
5003

<210> 62
<211> 1574
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類Sm22-α mRNA

<400> 62
tcaccacggc ggcagccctt taaacccctc acccagccag cgccccatcc tgtctgtccg
60

aacccagaca caagtcttca ctccttcctg cgagccctga ggaagccttg tgagtgcatt
120

ggctggggct tggagggaag ttgggctgga gctggacagg agcagtgggt gcatttcagg
180

caggctctcc tgaggtccca ggcgccagct ccagctccct ggctagggaa acccaccctc
240

tcagtcagca tgggggccca agctccaggc agggtgggct ggatcactag cgtcctggat
300

ctctctcaga ctgggcagcc ccgggctcat tgaaatgccc cggatgactt ggctagtgca
360

gaggaattga tggaaaccac cggggtgaga gggaggctcc ccatctcagc cagccacatc
420

cacaaggtgt gtgtaagggt gcaggcgccg gccggttagg ccaaggctct actgtctgtt
480

gcccctccag gagaacttcc aaggagcttt ccccagacat ggccaacaag ggtccttcct
540

atggcatgag ccgcgaagtg cagtccaaaa tcgagaagaa gtatgacgag gagctggagg
600

agcggctggt ggagtggatc atagtgcagt gtggccctga tgtgggccgc ccagaccgtg
660

ggcgcttggg cttccaggtc tggctgaaga atggcgtgat tctgagcaag ctggtgaaca
720

gcctgtaccc tgatggctcc aagccggtga aggtgcccga gaacccaccc tccatggtct
780

tcaagcagat ggagcaggtg gctcagttcc tgaaggcggc tgaggactat ggggtcatca
840

agactgacat gttccagact gttgacctct ttgaaggcaa agacatggca gcagtgcaga
900

ggaccctgat ggctttgggc agcttggcag tgaccaagaa tgatgggcac taccgtggag
960

atcccaactg gtttatgaag aaagcgcagg agcataagag ggaattcaca gagagccagc
1020

tgcaggaggg aaagcatgtc attggccttc agatgggcag caacagaggg gcctcccagg
1080

ccggcatgac aggctacgga cgacctcggc agatcatcag ttagagcgga gagggctagc
1140

cctgagcccg gccctccccc agctccttgg ctgcagccat cccgcttagc ctgcctcacc
1200

cacacccgtg tggtaccttc agccctggcc aagctttgag gctctgtcac tgagcaatgg
1260

taactgcacc tgggcagctc ctccctgtgc ccccagcctc agcccaactt cttacccgaa
1320

agcatcactg ccttggcccc tccctcccgg ctgcccccat cacctctact gtctcctccc
1380

tgggctaagc aggggagaag cgggctgggg gtagcctgga tgtgggccaa gtccactgtc
1440

ctccttggcg gcaaaagccc attgaagaag aaccagccca gcctgccccc tatcttgtcc
1500

tggaatattt ttggggttgg aactcaaaaa aaaaaaaaaa aaatcaatct tttctcaaaa
1560

aaaaaaaaaa aaaa
1574

<210> 63
<211> 521

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類Runx2蛋白

<400> 63

Met Ala Ser Asn Ser Leu Phe Ser Thr Val Thr Pro Cys Gln Gln Asn
1 5 10 15

Phe Phe Trp Asp Pro Ser Thr Ser Arg Arg Phe Ser Pro Pro Ser Ser
20 25 30

Ser Leu Gln Pro Gly Lys Met Ser Asp Val Ser Pro Val Val Ala Ala
35 40 45

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
65 70 75 80

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Arg Leu Arg Pro Pro
85 90 95

His Asp Asn Arg Thr Met Val Glu Ile Ile Ala Asp His Pro Ala Glu
100 105 110

Leu Val Arg Thr Asp Ser Pro Asn Phe Leu Cys Ser Val Leu Pro Ser
115 120 125

His Trp Arg Cys Asn Lys Thr Leu Pro Val Ala Phe Lys Val Val Ala
130 135 140

Leu Gly Glu Val Pro Asp Gly Thr Val Val Thr Val Met Ala Gly Asn
145 150 155 160

Asp Glu Asn Tyr Ser Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Ala Val Met Lys
165 170 175

Asn Gln Val Ala Arg Phe Asn Asp Leu Arg Phe Val Gly Arg Ser Gly
180 185 190

```
Arg Gly Lys Ser Phe Thr Leu Thr Ile Thr Val Phe Thr Asn Pro Pro
        195                 200                 205

Gln Val Ala Thr Tyr His Arg Ala Ile Lys Val Thr Val Asp Gly Pro
    210                 215                 220

Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Gln Lys Leu Asp Asp Ser Lys Pro Ser
225                 230                 235                 240

Leu Phe Ser Asp Arg Leu Ser Asp Leu Gly Arg Ile Pro His Pro Ser
                245                 250                 255

Met Arg Val Gly Val Pro Pro Gln Asn Pro Arg Pro Ser Leu Asn Ser
            260                 265                 270

Ala Pro Ser Pro Phe Asn Pro Gln Gly Gln Ser Gln Ile Thr Asp Pro
        275                 280                 285

Arg Gln Ala Gln Ser Ser Pro Pro Trp Ser Tyr Asp Gln Ser Tyr Pro
    290                 295                 300

Ser Tyr Leu Ser Gln Met Thr Ser Pro Ser Ile His Ser Thr Thr Pro
305                 310                 315                 320

Leu Ser Ser Thr Arg Gly Thr Gly Leu Pro Ala Ile Thr Asp Val Pro
                325                 330                 335

Arg Arg Ile Ser Asp Asp Asp Thr Ala Thr Ser Asp Phe Cys Leu Trp
            340                 345                 350

Pro Ser Thr Leu Ser Lys Lys Ser Gln Ala Gly Ala Ser Glu Leu Gly
        355                 360                 365

Pro Phe Ser Asp Pro Arg Gln Phe Pro Ser Ile Ser Ser Leu Thr Glu
    370                 375                 380

Ser Arg Phe Ser Asn Pro Arg Met His Tyr Pro Ala Thr Phe Thr Tyr
385                 390                 395                 400
```

```
Thr Pro Pro Val Thr Ser Gly Met Ser Leu Gly Met Ser Ala Thr Thr
                405                 410                 415

His Tyr His Thr Tyr Leu Pro Pro Pro Tyr Pro Gly Ser Ser Gln Ser
            420                 425                 430

Gln Ser Gly Pro Phe Gln Thr Ser Ser Thr Pro Tyr Leu Tyr Tyr Gly
        435                 440                 445

Thr Ser Ser Gly Ser Tyr Gln Phe Pro Met Val Pro Gly Gly Asp Arg
    450                 455                 460

Ser Pro Ser Arg Met Leu Pro Pro Cys Thr Thr Thr Ser Asn Gly Ser
465                 470                 475                 480

Thr Leu Leu Asn Pro Asn Leu Pro Asn Gln Asn Asp Gly Val Asp Ala
                485                 490                 495

Asp Gly Ser His Ser Ser Ser Pro Thr Val Leu Asn Ser Ser Gly Arg
            500                 505                 510

Met Asp Glu Ser Val Trp Arg Pro Tyr
        515                 520
```

<210> 64
<211> 524
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類Alp蛋白

<400> 64

```
Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
1               5                   10                  15

Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
            20                  25                  30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
        35                  40                  45
```

```
Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
    50                  55                  60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65                  70                  75                  80

Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
                85                  90                  95

Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
            100                 105                 110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
        115                 120                 125

Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
    130                 135                 140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
145                 150                 155                 160

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
                165                 170                 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
            180                 185                 190

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
        195                 200                 205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
    210                 215                 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu
225                 230                 235                 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp
                245                 250                 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg
            260                 265                 270
```

```
Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly
        275                 280                 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val
    290                 295                 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu
305                 310                 315                 320

Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
                325                 330                 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
            340                 345                 350

Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser
        355                 360                 365

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
    370                 375                 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
385                 390                 395                 400

Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
                405                 410                 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
            420                 425                 430

Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
        435                 440                 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys
    450                 455                 460

Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val
465                 470                 475                 480
```

```
Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His
                485                 490                 495

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu
            500                 505                 510

Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe
        515                 520
```

<210> 65
<211> 431
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類奧斯特里克斯蛋白

<400> 65

```
Met Ala Ser Ser Leu Leu Glu Glu Glu Val His Tyr Gly Ser Ser Pro
1               5                   10                  15

Leu Ala Met Leu Thr Ala Ala Cys Ser Lys Phe Gly Gly Ser Ser Pro
            20                  25                  30

Leu Arg Asp Ser Thr Thr Leu Gly Lys Ala Gly Thr Lys Lys Pro Tyr
        35                  40                  45

Ser Val Gly Ser Asp Leu Ser Ala Ser Lys Thr Met Gly Asp Ala Tyr
    50                  55                  60

Pro Ala Pro Phe Thr Ser Thr Asn Gly Leu Leu Ser Pro Ala Gly Ser
65                  70                  75                  80

Pro Pro Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Ala Asn Asp Tyr Pro Pro Phe Ser
                85                  90                  95

His Ser Phe Pro Gly Pro Thr Gly Thr Gln Asp Pro Gly Leu Leu Val
            100                 105                 110

Pro Lys Gly His Ser Ser Ser Asp Cys Leu Pro Ser Val Tyr Thr Ser
        115                 120                 125
```

```
Leu Asp Met Thr His Pro Tyr Gly Ser Trp Tyr Lys Ala Gly Ile His
    130                 135                 140

Ala Gly Ile Ser Pro Gly Pro Gly Asn Thr Pro Thr Pro Trp Trp Asp
145                 150                 155                 160

Met His Pro Gly Gly Asn Trp Leu Gly Gly Gly Gln Gly Gln Gly Asp
                165                 170                 175

Gly Leu Gln Gly Thr Leu Pro Thr Gly Pro Ala Gln Pro Pro Leu Asn
            180                 185                 190

Pro Gln Leu Pro Thr Tyr Pro Ser Asp Phe Ala Pro Leu Asn Pro Ala
        195                 200                 205

Pro Tyr Pro Ala Pro His Leu Leu Gln Pro Gly Pro Gln His Val Leu
    210                 215                 220

Pro Gln Asp Val Tyr Lys Pro Lys Ala Val Gly Asn Ser Gly Gln Leu
225                 230                 235                 240

Glu Gly Ser Gly Gly Ala Lys Pro Pro Arg Gly Ala Ser Thr Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Gly Arg Ser Ser Cys Asp Cys
            260                 265                 270

Pro Asn Cys Gln Glu Leu Glu Arg Leu Gly Ala Ala Ala Ala Gly Leu
        275                 280                 285

Arg Lys Lys Pro Ile His Ser Cys His Ile Pro Gly Cys Gly Lys Val
    290                 295                 300

Tyr Gly Lys Ala Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Trp His Thr Gly
305                 310                 315                 320

Glu Arg Pro Phe Val Cys Asn Trp Leu Phe Cys Gly Lys Arg Phe Thr
                325                 330                 335

Arg Ser Asp Glu Leu Glu Arg His Val Arg Thr His Thr Arg Glu Lys
            340                 345                 350
```

```
Lys Phe Thr Cys Leu Leu Cys Ser Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp His
        355                 360                 365

Leu Ser Lys His Gln Arg Thr His Gly Glu Pro Gly Pro Gly Pro Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Gly Pro Lys Glu Leu Gly Glu Gly Arg Ser Thr Gly Glu Glu
385                 390                 395                 400

Glu Ala Ser Gln Thr Pro Arg Pro Ser Ala Ser Pro Ala Thr Pro Glu
                405                 410                 415

Lys Ala Pro Gly Gly Ser Pro Glu Gln Ser Asn Leu Leu Glu Ile
            420                 425                 430
```

<210> 66
<211> 1012
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類克羅索蛋白

<400> 66

```
Met Pro Ala Ser Ala Pro Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro Pro Pro Ser
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Leu Gly Gly Arg Arg Leu Arg
            20                  25                  30

Ala Glu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ser Arg Pro
        35                  40                  45

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Phe Gln Gly Thr Phe Pro Asp Gly
    50                  55                  60

Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly Gly Trp
65                  70                  75                  80

Gln Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr His His
                85                  90                  95
```

```
Pro Leu Ala Pro Pro Gly Asp Ser Arg Asn Ala Ser Leu Pro Leu Gly
            100                 105                 110

Ala Pro Ser Pro Leu Gln Pro Ala Thr Gly Asp Val Ala Ser Asp Ser
        115                 120                 125

Tyr Asn Asn Val Phe Arg Asp Thr Glu Ala Leu Arg Glu Leu Gly Val
    130                 135                 140

Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly
145                 150                 155                 160

Ser Ala Gly Val Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg Arg Leu
                165                 170                 175

Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr Leu Tyr
            180                 185                 190

His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Trp Ala
        195                 200                 205

Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe
    210                 215                 220

Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp Asn Pro
225                 230                 235                 240

Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala Pro Gly
                245                 250                 255

Ile Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro
        275                 280                 285

Thr Gln Gly Gly Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp Ile Asn
    290                 295                 300
```

```
Pro Arg Arg Met Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp Gly Asp
                325                 330                 335

Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro Asp Phe
            340                 345                 350

Thr Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala
        355                 360                 365

Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met
    370                 375                 380

Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp
385                 390                 395                 400

Ile Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly
                405                 410                 415

Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr
            420                 425                 430

Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys Leu Asp
        435                 440                 445

Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe
    450                 455                 460

Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
465                 470                 475                 480

Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe
                485                 490                 495

Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn
            500                 505                 510

Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val
        515                 520                 525
```

```
Asp Asn Tyr Ile Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr Asp Leu
    530                 535                 540

Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val
545                 550                 555                 560

Asp Gly Val Val Thr Lys Lys Arg Lys Ser Tyr Cys Val Asp Phe Ala
                565                 570                 575

Ala Ile Gln Pro Gln Ile Ala Leu Leu Gln Glu Met His Val Thr His
            580                 585                 590

Phe Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu Ile Leu Pro Leu Gly Asn Gln
        595                 600                 605

Ser Gln Val Asn His Thr Ile Leu Gln Tyr Tyr Arg Cys Met Ala Ser
    610                 615                 620

Glu Leu Val Arg Val Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp Gln Pro
625                 630                 635                 640

Met Ala Pro Asn Gln Gly Leu Pro Arg Leu Leu Ala Arg Gln Gly Ala
                645                 650                 655

Trp Glu Asn Pro Tyr Thr Ala Leu Ala Phe Ala Glu Tyr Ala Arg Leu
            660                 665                 670

Cys Phe Gln Glu Leu Gly His His Val Lys Leu Trp Ile Thr Met Asn
        675                 680                 685

Glu Pro Tyr Thr Arg Asn Met Thr Tyr Ser Ala Gly His Asn Leu Leu
    690                 695                 700

Lys Ala His Ala Leu Ala Trp His Val Tyr Asn Glu Lys Phe Arg His
705                 710                 715                 720

Ala Gln Asn Gly Lys Ile Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp Ile Glu
                725                 730                 735
```

```
Pro Ala Cys Pro Phe Ser Gln Lys Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Val
            740                 745                 750

Leu Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly Ser Gly
        755                 760                 765

Asp Tyr Pro Trp Val Met Arg Asp Trp Leu Asn Gln Arg Asn Asn Phe
    770                 775                 780

Leu Leu Pro Tyr Phe Thr Glu Asp Glu Lys Lys Leu Ile Gln Gly Thr
785                 790                 795                 800

Phe Asp Phe Leu Ala Leu Ser His Tyr Thr Thr Ile Leu Val Asp Ser
                805                 810                 815

Glu Lys Glu Asp Pro Ile Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val Gln Glu
            820                 825                 830

Met Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala Val Val
        835                 840                 845

Pro Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Lys Phe Lys Tyr Gly
    850                 855                 860

Asp Leu Pro Met Tyr Ile Ile Ser Asn Gly Ile Asp Asp Gly Leu His
865                 870                 875                 880

Ala Glu Asp Asp Gln Leu Arg Val Tyr Tyr Met Gln Asn Tyr Ile Asn
                885                 890                 895

Glu Ala Leu Lys Ala His Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Cys Gly Tyr
            900                 905                 910

Phe Ala Tyr Ser Phe Asn Asp Arg Thr Ala Pro Arg Phe Gly Leu Tyr
        915                 920                 925

Arg Tyr Ala Ala Asp Gln Phe Glu Pro Lys Ala Ser Met Lys His Tyr
    930                 935                 940

Arg Lys Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Glu Thr Leu Glu
945                 950                 955                 960
```

```
Arg Phe Cys Pro Glu Glu Phe Thr Val Cys Thr Glu Cys Ser Phe Phe
                965                 970                 975

His Thr Arg Lys Ser Leu Leu Ala Phe Ile Ala Phe Leu Phe Phe Ala
            980                 985                 990

Ser Ile Ile Ser Leu Ser Leu Ile  Phe Tyr Tyr Ser Lys  Lys Gly Arg
        995                 1000                1005

Arg Ser  Tyr Lys
    1010
```

<210> 67
<211> 201
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類Sm22-α蛋白

<400> 67

```
Met Ala Asn Lys Gly Pro Ser Tyr Gly Met Ser Arg Glu Val Gln Ser
1               5                   10                  15

Lys Ile Glu Lys Lys Tyr Asp Glu Glu Leu Glu Glu Arg Leu Val Glu
            20                  25                  30

Trp Ile Ile Val Gln Cys Gly Pro Asp Val Gly Arg Pro Asp Arg Gly
        35                  40                  45

Arg Leu Gly Phe Gln Val Trp Leu Lys Asn Gly Val Ile Leu Ser Lys
    50                  55                  60

Leu Val Asn Ser Leu Tyr Pro Asp Gly Ser Lys Pro Val Lys Val Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asn Pro Pro Ser Met Val Phe Lys Gln Met Glu Gln Val Ala Gln
                85                  90                  95

Phe Leu Lys Ala Ala Glu Asp Tyr Gly Val Ile Lys Thr Asp Met Phe
            100                 105                 110
```

```
Gln Thr Val Asp Leu Phe Glu Gly Lys Asp Met Ala Ala Val Gln Arg
        115                 120                 125

Thr Leu Met Ala Leu Gly Ser Leu Ala Val Thr Lys Asn Asp Gly His
    130                 135                 140

Tyr Arg Gly Asp Pro Asn Trp Phe Met Lys Lys Ala Gln Glu His Lys
145                 150                 155                 160

Arg Glu Phe Thr Glu Ser Gln Leu Gln Glu Gly Lys His Val Ile Gly
                165                 170                 175

Leu Gln Met Gly Ser Asn Arg Gly Ala Ser Gln Ala Gly Met Thr Gly
            180                 185                 190

Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ile Ile Ser
        195                 200
```

<210> 68
<211> 377
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類α-SMA蛋白

<400> 68

```
Met Cys Glu Glu Glu Asp Ser Thr Ala Leu Val Cys Asp Asn Gly Ser
1               5                   10                  15

Gly Leu Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val
            20                  25                  30

Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met Val Gly
        35                  40                  45

Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg
    50                  55                  60

Gly Ile Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Ile Thr Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Ser Phe Tyr Asn Glu Leu
                85                  90                  95

Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu
            100                 105                 110

Asn Pro Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr Gln Ile Met Phe Glu Thr
        115                 120                 125

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

Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly
145                 150                 155                 160

Val Thr His Asn Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala
                165                 170                 175

Ile Met Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met
            180                 185                 190

Lys Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Val Thr Thr Ala Glu Arg
        195                 200                 205

Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp
    210                 215                 220

Phe Glu Asn Glu Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu Glu Lys
225                 230                 235                 240

Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg
                245                 250                 255

Phe Arg Cys Pro Glu Thr Leu Phe Gln Pro Ser Phe Ile Gly Met Glu
            260                 265                 270

Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp
        275                 280                 285
```

Ile Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Asn Val Leu Ser Gly Gly
290 295 300

Thr Thr Met Tyr Pro Gly Ile Ala Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr
305 310 315 320

Ala Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu
325 330 335

Arg Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser
340 345 350

Thr Phe Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ala Gly
355 360 365

Pro Ser Ile Val His Arg Lys Cys Phe
370 375

<210> 69
<211> 986
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類MYOCD蛋白

<400> 69

Met Thr Leu Leu Gly Ser Glu His Ser Leu Leu Ile Arg Ser Lys Phe
1 5 10 15

Arg Ser Val Leu Gln Leu Arg Leu Gln Gln Arg Arg Thr Gln Glu Gln
20 25 30

Leu Ala Asn Gln Gly Ile Ile Pro Pro Leu Lys Arg Pro Ala Glu Phe
35 40 45

His Glu Gln Arg Lys His Leu Asp Ser Asp Lys Ala Lys Asn Ser Leu
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Arg Asn Arg Cys Asn Ser Ala Asp Leu Val Asn Met
65 70 75 80

```
His Ile Leu Gln Ala Ser Thr Ala Glu Arg Ser Ile Pro Thr Ala Gln
                85                  90                  95

Met Lys Leu Lys Arg Ala Arg Leu Ala Asp Asp Leu Asn Glu Lys Ile
            100                 105                 110

Ala Leu Arg Pro Gly Pro Leu Glu Leu Val Glu Lys Asn Ile Leu Pro
        115                 120                 125

Val Asp Ser Ala Val Lys Glu Ala Ile Lys Gly Asn Gln Val Ser Phe
    130                 135                 140

Ser Lys Ser Thr Asp Ala Phe Ala Phe Glu Glu Asp Ser Ser Ser Asp
145                 150                 155                 160

Gly Leu Ser Pro Asp Gln Thr Arg Ser Glu Asp Pro Gln Asn Ser Ala
                165                 170                 175

Gly Ser Pro Pro Asp Ala Lys Ala Ser Asp Thr Pro Ser Thr Gly Ser
            180                 185                 190

Leu Gly Thr Asn Gln Asp Leu Ala Ser Gly Ser Glu Asn Asp Arg Asn
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Ser Gln Pro Ser His Gln Ser Asp Ala Gly Lys Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Ile Ala Val His Ala Ala Val Lys Ser
225                 230                 235                 240

Lys Ser Leu Gly Asp Ser Lys Asn Arg His Lys Lys Pro Lys Asp Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Val Lys Lys Leu Lys Tyr His Gln Tyr Ile Pro Pro Asp
            260                 265                 270

Gln Lys Ala Glu Lys Ser Pro Pro Pro Met Asp Ser Ala Tyr Ala Arg
        275                 280                 285

Leu Leu Gln Gln Gln Gln Leu Phe Leu Gln Leu Gln Ile Leu Ser Gln
    290                 295                 300
```

```
Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Arg Phe Ser Tyr Leu Gly Met His Gln
305                 310                 315                 320

Ala Gln Leu Lys Glu Pro Asn Glu Gln Met Val Arg Asn Pro Asn Ser
                325                 330                 335

Ser Ser Thr Pro Leu Ser Asn Thr Pro Leu Ser Pro Val Lys Asn Ser
            340                 345                 350

Phe Ser Gly Gln Thr Gly Val Ser Ser Phe Lys Pro Gly Pro Leu Pro
        355                 360                 365

Pro Asn Leu Asp Asp Leu Lys Val Ser Glu Leu Arg Gln Gln Leu Arg
    370                 375                 380

Ile Arg Gly Leu Pro Val Ser Gly Thr Lys Thr Ala Leu Met Asp Arg
385                 390                 395                 400

Leu Arg Pro Phe Gln Asp Cys Ser Gly Asn Pro Val Pro Asn Phe Gly
                405                 410                 415

Asp Ile Thr Thr Val Thr Phe Pro Val Thr Pro Asn Thr Leu Pro Asn
            420                 425                 430

Tyr Gln Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ala Leu Ser Asn Gly Phe Tyr His
        435                 440                 445

Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ser Pro Pro Ile Ser Pro Ala Ser Ser Asp
    450                 455                 460

Leu Ser Val Ala Gly Ser Leu Pro Asp Thr Phe Asn Asp Ala Ser Pro
465                 470                 475                 480

Ser Phe Gly Leu His Pro Ser Pro Val His Val Cys Thr Glu Glu Ser
                485                 490                 495

Leu Met Ser Ser Leu Asn Gly Gly Ser Val Pro Ser Glu Leu Asp Gly
            500                 505                 510
```

```
Leu Asp Ser Glu Lys Asp Lys Met Leu Val Glu Lys Gln Lys Val Ile
        515                 520                 525

Asn Glu Leu Thr Trp Lys Leu Gln Gln Glu Gln Arg Gln Val Glu Glu
    530                 535                 540

Leu Arg Met Gln Leu Gln Lys Gln Lys Arg Asn Asn Cys Ser Glu Lys
545                 550                 555                 560

Lys Pro Leu Pro Phe Leu Ala Ala Ser Ile Lys Gln Glu Glu Ala Val
                565                 570                 575

Ser Ser Cys Pro Phe Ala Ser Gln Val Pro Val Lys Arg Gln Ser Ser
            580                 585                 590

Ser Ser Glu Cys His Pro Pro Ala Cys Glu Ala Ala Gln Leu Gln Pro
        595                 600                 605

Leu Gly Asn Ala His Cys Val Glu Ser Ser Asp Gln Thr Asn Val Leu
    610                 615                 620

Ser Ser Thr Phe Leu Ser Pro Gln Cys Ser Pro Gln His Ser Pro Leu
625                 630                 635                 640

Gly Ala Val Lys Ser Pro Gln His Ile Ser Leu Pro Pro Ser Pro Asn
                645                 650                 655

Asn Pro His Phe Leu Pro Ser Ser Ser Gly Ala Gln Gly Glu Gly His
            660                 665                 670

Arg Val Ser Ser Pro Ile Ser Ser Gln Val Cys Thr Ala Gln Asn Ser
        675                 680                 685

Gly Ala His Asp Gly His Pro Pro Ser Phe Ser Pro His Ser Ser Ser
    690                 695                 700

Leu His Pro Pro Phe Ser Gly Ala Gln Ala Asp Ser Ser His Gly Ala
705                 710                 715                 720

Gly Gly Asn Pro Cys Pro Lys Ser Pro Cys Val Gln Gln Lys Met Ala
                725                 730                 735
```

```
Gly Leu His Ser Ser Asp Lys Val Gly Pro Lys Phe Ser Ile Pro Ser
            740                 745                 750

Pro Thr Phe Ser Lys Ser Ser Ser Ala Ile Ser Glu Val Thr Gln Pro
        755                 760                 765

Pro Ser Tyr Glu Asp Ala Val Lys Gln Gln Met Thr Arg Ser Gln Gln
    770                 775                 780

Met Asp Glu Leu Leu Asp Val Leu Ile Glu Ser Gly Glu Met Pro Ala
785                 790                 795                 800

Asp Ala Arg Glu Asp His Ser Cys Leu Gln Lys Val Pro Lys Ile Pro
                805                 810                 815

Arg Ser Ser Arg Ser Pro Thr Ala Val Leu Thr Lys Pro Ser Ala Ser
            820                 825                 830

Phe Glu Gln Ala Ser Ser Gly Ser Gln Ile Pro Phe Asp Pro Tyr Ala
        835                 840                 845

Thr Asp Ser Asp Glu His Leu Glu Val Leu Leu Asn Ser Gln Ser Pro
    850                 855                 860

Leu Gly Lys Met Ser Asp Val Thr Leu Leu Lys Ile Gly Ser Glu Glu
865                 870                 875                 880

Pro His Phe Asp Gly Ile Met Asp Gly Phe Ser Gly Lys Ala Ala Glu
                885                 890                 895

Asp Leu Phe Asn Ala His Glu Ile Leu Pro Gly Pro Leu Ser Pro Met
            900                 905                 910

Gln Thr Gln Phe Ser Pro Ser Ser Val Asp Ser Asn Gly Leu Gln Leu
        915                 920                 925

Ser Phe Thr Glu Ser Pro Trp Glu Thr Met Glu Trp Leu Asp Leu Thr
    930                 935                 940
```

Pro Pro Asn Ser Thr Pro Gly Phe Ser Ala Leu Thr Thr Ser Ser Pro
945 950 955 960

Ser Ile Phe Asn Ile Asp Phe Leu Asp Val Thr Asp Leu Asn Leu Asn
965 970 975

Ser Ser Met Asp Leu His Leu Gln Gln Trp
980 985

<210> 70
<211> 1798
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類α-SMA mRNA

<400> 70
ctctccccgc ccccgcgggg cggcgcgcac tcacccaccc gcgccggagc ggacctttgg
60

cttggcttgt cagggcttgt ccaggagttc cgctcctctc tccaaccggg gtccccctcc
120

agcgacccta aagcttccca gacttccgct tcaattcctg tccgcacccc acgcccacct
180

caacgtggag cgcagtggtc tccgaggagc gccggagctg ccccgcctgc ccagcggggt
240

cagcacttcg catcaaggcc caagaaaagc aagtcctcca gcgttctgag cacccgggcc
300

tgagggaagg tcctaacagc ccccgggagc cagtctccaa cgcctcccgc agcagcccgc
360

cgctcccagg tgcccgcgtg cgccgctgcc gccgcaatcc cgcacgcgtc ccgcgcccgc
420

cccactttgc ctatccccgg gactaagacg ggaatcctgt gaagcagctc cagctatgtg
480

tgaagaagag gacagcactg ccttggtgtg tgacaatggc tctgggctct gtaaggccgg
540

ctttgctggg gacgatgctc ccagggctgt tttcccatcc attgtgggac gtcccagaca
600

tcaggggggtg atggtgggaa tgggacaaaa agacagctac gtgggtgacg aagcacagag
660

caaaagagga atcctgaccc tgaagtaccc gatagaacat ggcatcatca ccaactggga
720

cgacatggaa aagatctggc accactcttt ctacaatgag cttcgtgttg cccctgaaga
780

gcatcccacc ctgctcacgg aggcacccct gaaccccaag gccaaccggg agaaaatgac
840

tcaaattatg tttgagactt tcaatgtccc agccatgtat gtggctatcc aggcggtgct
900

gtctctctat gcctctggac gcacaactgg catcgtgctg gactctggag atggtgtcac
960

ccacaatgtc cccatctatg agggctatgc cttgccccat gccatcatgc gtctggatct
1020

ggctggccga gatctcactg actacctcat gaagatcctg actgagcgtg gctattcctt
1080

cgttactact gctgagcgtg agattgtccg ggacatcaag gagaaactgt gttatgtagc
1140

tctggacttt gaaaatgaga tggccactgc cgcatcctca tcctcccttg agaagagtta
1200

cgagttgcct gatgggcaag tgatcaccat cggaaatgaa cgtttccgct gcccagagac
1260

cctgttccag ccatccttca tcgggatgga gtctgctggc atccatgaaa ccacctacaa
1320

cagcatcatg aagtgtgata ttgacatcag gaaggacctc tatgctaaca atgtcctatc
1380

agggggcacc actatgtacc ctggcattgc cgaccgaatg cagaaggaga tcacggccct
1440

agcacccagc accatgaaga tcaagatcat tgcccctccg gagcgcaaat actctgtctg
1500

gatcggtggc tccatcctgg cctctctgtc caccttccag cagatgtgga tcagcaaaca
1560

ggaatacgat gaagccgggc cttccattgt ccaccgcaaa tgcttctaaa acactttcct
1620

gctcctctct gtctctagca cacaactgtg aatgtcctgt ggaattatgc cttcagttct
1680

tttccaaatc attcctagcc aaagctctga ctcgttacct atgtgttttt taataaatct
1740

gaaataggct actggtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa
1798

<210> 71
<211> 8580
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類MYOCD mRNA

<400> 71
aatcgccggc agcctatgac atcagacagg aacgcctggg atgccgcgct gctcctggcc
60

aacctccgag gaggaggagg gtcccgccgg ctaagagtta attagccccg cacggcgagg
120

ggggaggcgc cagttttctg gggacactgg ctgccactgt actcctaccc aggggagctc
180

acggagagtt ggatgaattc tgggttgtta gctgcggtca gctgggctcc cgggagcctg
240

ttgctggtgg agaacagggg gcgcctggcc aagggaccag cggcttgctg agactcaaca
300

tgacactcct ggggtctgag cattccttgc tgattaggag caagttcaga tcagttttac
360

agttaagact tcaacaaaga aggacccagg aacaactggc taaccaaggc ataataccac
420

cactgaaacg tccagctgaa ttccatgagc aaagaaaaca tttggatagt gacaaggcta
480

aaaattccct gaagcgcaaa gccagaaaca ggtgcaacag tgccgacttg gttaatatgc
540

acatactcca agcttccact gcagagaggt ccattccaac tgctcagatg aagctgaaaa
600

gagcccgact cgccgatgat ctcaatgaaa aaattgctct acgaccaggg ccactggagc
660

tggtggaaaa aaacattctt cctgtggatt ctgctgtgaa agaggccata aaaggtaacc
720

aggtgagttt ctccaaatcc acggatgctt ttgcctttga agaggacagc agcagcgatg
780

ggctttctcc ggatcagact cgaagtgaag acccccaaaa ctcagcggga tccccgccag
840

acgctaaagc ctcagatacc ccttcgacag gttctctggg gacaaaccag gatcttgctt
900

ctggctcaga aaatgacaga aatgactcag cctcacagcc cagccaccag tcagatgcgg
960

ggaagcaggg gcttggcccc cccagcaccc ccatagccgt gcatgctgct gtaaagtcca
1020

aatccttggg tgacagtaag aaccgccaca aaaagcccaa ggaccccaag ccaaaggtga
1080

agaagcttaa atatcaccag tacattcccc cagaccagaa ggcagagaag tcccctccac
1140

ctatggactc agcctacgct cggctgctcc agcaacagca gctgttcctg cagctccaaa
1200

tcctcagcca gcagcagcag cagcagcaac accgattcag ctacctaggg atgcaccaag
1260

ctcagcttaa ggaaccaaat gaacagatgg tcagaaatcc aaactcttct tcaacgccac
1320

tgagcaatac ccccttgtct cctgtcaaaa acagtttttc tggacaaact ggtgtctctt
1380

ctttcaaacc aggcccactc ccacctaacc tggatgatct gaaggtctct gaattaagac
1440

aacagcttcg aattcggggc ttgcctgtgt caggcaccaa aacggctctc atggaccggc
1500

ttcgaccctt ccaggactgc tctggcaacc cagtgccgaa ctttggggat ataacgactg
1560

tcacttttcc tgtcacaccc aacacgctgc ccaattacca gtcttcctct tctaccagtg
1620

ccctgtccaa cggcttctac cactttggca gcaccagctc cagccccccg atctccccag
1680

cctcctctga cctgtcagtc gctgggtccc tgccggacac cttcaatgat gcctcccccct
1740

ccttcggcct gcacccgtcc ccagtccacg tgtgcacgga ggaaagtctc atgagcagcc
1800

tgaatggggg ctctgttcct tctgagctgg atgggctgga ctccgagaag gacaagatgc
1860

tggtggagaa gcagaaggtg atcaatgaac tcacctggaa actccagcaa gagcagaggc
1920

aggtggagga gctgaggatg cagcttcaga agcagaaaag gaataactgt tcagagaaga
1980

agccgctgcc tttcctggct gcctccatca agcaggaaga ggctgtctcc agctgtcctt
2040

ttgcatccca agtacctgtg aaaagacaaa gcagcagctc agagtgtcac ccaccggctt
2100

gtgaagctgc tcaactccag cctcttggaa atgctcattg tgtggagtcc tcagatcaaa
2160

ccaatgtact ttcttccaca tttctcagcc cccagtgttc ccctcagcat tcaccgctgg
2220

gggctgtgaa aagcccacag cacatcagtt tgcccccatc acccaacaac cctcactttc
2280

tgccctcatc ctccggggcc cagggagaag ggcacagggt ctcctcgccc atcagcagcc
2340

aggtgtgcac tgcacagaac tcaggagcac acgatggcca tcctccaagc ttctctcccc
2400

attcttccag cctccacccg cccttctctg gagcccaagc agacagcagt catggtgccg
2460

ggggaaaccc ttgtcccaaa agcccatgtg tacagcaaaa gatggctggt ttacactctt
2520

ctgataaggt ggggccaaag ttttcaattc catccccaac tttttctaag tcaagttcag
2580

caatttcaga ggtaacacag cctccatcct atgaagatgc cgtaaagcag caaatgaccc
2640

ggagtcagca gatggatgaa ctcctggacg tgcttattga aagcggagaa atgccagcag
2700

acgctagaga ggatcactca tgtcttcaaa aagtcccaaa gatacccaga tcttcccgaa
2760

gtccaactgc tgtcctcacc aagccctcgg cttcctttga acaagcctct tcaggcagcc
2820

agatcccctt tgatccctat gccaccgaca gtgatgagca tcttgaagtc ttattaaatt
2880

cccagagccc cctaggaaag atgagtgatg tcacccttct aaaaattggg agcgaagagc
2940

ctcactttga tgggataatg gatggattct ctgggaaggc tgcagaagac ctcttcaatg
3000

cacatgagat cttgccaggc cccctctctc caatgcagac acagttttca ccctcttctg
3060

tggacagcaa tgggctgcag ttaagcttca ctgaatctcc ctgggaaacc atggagtggc
3120

tggacctcac tccgccaaat tccacaccag gctttagcgc cctcaccacc agcagcccca
3180

gcatcttcaa catcgatttc ctggatgtca ctgatctcaa tttgaattct tccatggacc
3240

ttcacttgca gcagtggtag aatgcccaat gcaccagtgc tatggaagac caatggagtt
3300

ccatggggga aagcacacag ccatacatac tttactgtcc aaaaacagaa gaagaagaag
3360

agaattaaaa agaagcaatg atttctgtgc caatgaacaa gaacaaaagt catttttaga
3420

aatacatata ctgtaatatt taccaacagt cagtaactgt taatgatttc aacaatgcat
3480

taaaagaatg tgctttctca gattaaggat gccaaaaaag atatttcact gccttttcaa
3540

agaccagtat attttctagc ccataatttt tctcaggcat tgttggggca taagctcaca
3600

ctgtaagctt ttctcatgaa ttcactagac ataacgtgga aggaaaacgt agtcttttgg
3660

gagtacaggg aagccagccc ctcaaagctt atggaagaca tacctgcaat ggaagctgtt
3720

gcccaatgtc tccattacta tctttcaaaa gagaagccag acccagcttc agatcaaaag
3780

ttcttgagac agaggaacaa aaccaatcga tttccaggga agctaatcaa ctctcttttc
3840

cctctaccac aaaactgccc tgctggagtg gttctgaacc tgtacccagg actcgatgtg
3900

gtcactaata acaattaacc tgaactgagt ccacagaact ccactcggaa ctttcttctt
3960

ttttaactag tggcccaatc attcccacca tctctgtgct gataagtacg tgtcctagat
4020

gagaaccctg aagaatgcag accttcttcc cccgaaggag atgccacaag ctctccaaca
4080

cagccccctt tagttccaaa gactagagat gaccacattg gtagaagtat atctcgaggc
4140

acaggaaggg agccccacca gggataattc agacaggact agagaataac atcatttcac
4200

ataccctggg ataaacaccc tgggttccta tagaaggact attacttatg ggagtccaac
4260

ttctcctttt gttttgttat tatcagttta tctttctccc actccacttt tccttcaagg
4320

taccaatcct ttcctgttcc tcgtttggcc atctttcttt ttctgcctcc acattgggag
4380

gggaggactt ctcagttcta acaagctgcc atactcctaa gaaagccatt tttgaaaaat
4440

ttaacaatcc aggttcttct ggagaactca ttctccacac gcacagtttg ctgcaaaagg
4500

aagttgcaag aatttcttga ggaagaaact ggtgacttgg tccatcagtc acgaagttct
4560

ttctattctc gtttagtttt caagaaatta ttggtttgtg ttgctctggg gaaattggaa
4620

atcattacat tgtaaagaca aatatggatg atatttacaa gagagaattt cagatctggg
4680

tttttgaaag aaaacagaat tgcgcattga aaacgatgga aggaaaaaga caatggtcta
4740

atgtgcattc ctcattacct ctcgtggctt tggctgggag ttggaaaaag ctaaaatttc
4800

agaacagtct ctgtaaggct ctctgtggct ccagttcacc attttatatt gttgcatgct
4860

gtagaaagga gctattgctg ttgttttgtt tttttattta aatcactaag gcactgtttt
4920

tatcttttgt aaaaaaaaaa aaaaagttgt tcactgtgca cttatagaaa aaataatcaa
4980

aaatgttggg attttagaag ctctcttttt gataaaccaa agatttagaa gtcattccat
5040

tgttaacttg taaaaatgtg tgaacacaga gagtttttgg tgattgctac tctgaaagct
5100

gccagatctt attctggggg tgggatgtgg aggaatacac atacacacac aaacatacat
5160

gtatgtataa tagatatata catatgtgta tattatatct gtgtgtgcat gtatctccaa
5220

aagcggcgtt acagagttct acaccaaaag cctttaaccc ttaatctgct gtgaatgata
5280

cctggccttt ctcactatga atttctgatt aaccaaccag actacacgtt gcctctctgt
5340

gtatgactaa cggctccaac ccgatgactc acagctactt gcttatcgtg aacaagctca
5400

tcttggcaat gaatatggat gtgaaaagac agaacagctt caccattagt agctggaaat
5460

ggtatcacag tctcttatag aggaatatga aaggaacaag aaaatcattt tacattcctt
5520

ttatctgtat tgtgctttaa aagatccaca tggtaaattt tttattttgc ttttatgtca
5580

gtcatcagaa ccaaaaaaat ccagaagaaa aaattgccag tgtttccttt gaagatgaag
5640

ctactgggga agaaaacctt attaatacac tccacacatt tgttcattcc tcagctgttg
5700

gtgttttctt ggggtcttga caaagcttgc tggtcagtgc acttttcagg tgtcacgttt
5760

tgctgtttgt atgtttttc ttccccttac ttcctttgga aaacaaactc acacagtgcc
5820

cctactctga gacctgggac tgagtgttaa ttatttttc cttgggtatt tctatctgag
5880

agactagacc tagttaggag gcctctgtac ttctccagat tgtacctttt tatggggatc
5940

tttgaggcta tgacccagga ctgatagata tgccttacgg aagacaaaag ataaaatggt
6000

tcctatatcc taatgcaaac caacacagtt aaaagagcag atctctggat aactgctctc
6060

aacctgcttc tacagtctcc acaaaccgca ttcaccctct ctcttcatag ctcagacatg
6120

aaatttgagg gagaaaactg gagataattg ggagaaaatt gatgaagttg gctgcttcca
6180

gtagatcaga taatccatga atttgtctcc cattgagaat tttattttaa attcttttaa
6240

actcttcgtt gtgtcttttg tgatgacaaa tcaggcatga ctaaaagatg tacagagact
6300

tacgaagatg gtcacattca agttccctaa tgctcttaga acctgaagat gaccatgtgt
6360

agttttctta agacctctga acccccatgg tgatgaagac ttgaagacat ttgcagctat
6420

ctgctgcagt ctggtagatt catacttatc taaagaagtc aaaaaattta ttcgtgcaag
6480

tgcttgcagg aagccagtgc ttattagtag tgaccctgct tctatcaacg ttattgagac
6540

aacacatatt ctattctaag ggagaaagag ggaggaagag agggagggag ggaggaagaa
6600

gagggaggga gcgaggaagg aagataggag atgggtaggg gggtaaagag aaaaggaggg
6660

agaagggaag gaaggaaaga agagaggaaa gaaaggaggg aaggaaaaaa gggccaaact
6720

ttctgatcta tgaacttctc agttcagctg tcacattatg agaagtaaat cagaattttt
6780

ttaaggagaa gtcattctta gcactacaat aattgtacca gtaattgagg aaaccaagac
6840

aatcttcacc tgaataatag agggtctgag aactgtcagc cttttgccat tcaaaaacat
6900

ttatgtccaa cctgaaaaaa aagcatcaat aaaacctatc ccaagcattc aaaatagtcc
6960

tttccaaatg ttatttattt taaagtcaat cagctctttt agaaacagat tctggtctgg
7020

ctgaaaactc ccacaacaaa tttactcatc cagtggctaa tatttaatgc ccaccatggg
7080

cagagcacac aaatcttcag ataaacaata ctgaattgat tcagcacaga ttgttcagat
7140

ttgaatgacc agggagttgt atttgcacat gcaagaacac taagaatctc ccagtcctca
7200

aactagaaac ctttcagcta cgatgaaaaa aaaaaagggg tcttcatttt tccaagaggg
7260

ggtggaggtg gggatcactt tttagctaaa agctatctct cacttcaaaa ttcttgtctt
7320

tttctttgtg gacaaacacc agtagtctat cacttggaga tcttttaata tctcccatca
7380

tttaaaacat ccacgagagt ttgaagattt gtgttgattg ccagatacag aagccccttg
7440

aaaataagga aagggtggag gaagcatttt tgtgtcctat ccctacttat cgtagcagct
7500

ctatagacaa aagggacact tactggtgag cctctggccc ttaaaagaaa atcatctaag
7560

aatatgaagg caatttgatt tccccccaca gccctcagct gccttcctca cagaaggaag
7620

ttcccaaaat tgctggtaca cagtttgcaa tcaaatatca gatatgagaa aacctgtagt
7680

gaagagtctg ggttcttggt tttctcataa atccaatata aatttgtagg ttggttcagg
7740

gtcaaaattg ccagtgcttt attagacaga tgatactgat agacacacag agcccaggtc
7800

ctggaacaag acaatcctgt agtgccaaga tctggtcagt tgcgttaagg agctgggttt
7860

gattctagag tccaggttta tagagaaacc ctggctagat tgagcctacc catggggaga
7920

cgatttcaag acaggatgag atctgggaag aattttgttg tcatctgcca gggaaattat
7980

cacaggactc attgaatgca ataacatgtg agtaagttcc cttttgattc tgggaatcag
8040

cgattttccc tgtggattaa gacaaaccaa cgccagaagg tctcctgtgc ttattttaac
8100

catctgctcc catcgtgaac cctggagcat gcatttccta gaagtggttt catagctcct
8160

gtgtgttcat ggaaaagggg agtataatga tggggatgct ggaagctttt ttaatgtttt
8220

ccaaaggaaa ggaacccaca ctgctcccca gagttccttt ccaatggccc tgcagtaaga
8280

acggaggaca atgtattgct gggtgcttaa aatcctccct cagtgaagca caaagagaca
8340

ctttgtaaag aaaaaaagag caagcatagg ttctctgtgg gaccttgtgg agtggtgttt
8400

tcacgttggt ctctttggct caattgagca taatcagaaa gaaatgtggg ttattgggaa
8460

gagacaaaaa gcagtggcta aaataccaaa gttggcatgt gttctttttt aaaaaaaaaa
8520

aaaaatgcat atatttttaa ataaaatgtt tattttaaaa agaaaaaaaa aaaaaaaaaa
8580

<210> 72
<211> 524
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類BSAP蛋白

<400> 72

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
1 5 10 15

Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
20 25 30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
35 40 45

Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
50 55 60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65 70 75 80

Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
85 90 95

Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
100 105 110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
115 120 125

Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly

130 135 140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
145 150 155 160

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
165 170 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
180 185 190

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
195 200 205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu
225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg
260 265 270

Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly
275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val
290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu
305 310 315 320

Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
340 345 350

```
Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser
        355                 360                 365

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
    370                 375                 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
385                 390                 395                 400

Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
                405                 410                 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
            420                 425                 430

Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
        435                 440                 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys
    450                 455                 460

Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val
465                 470                 475                 480

Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His
                485                 490                 495

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu
            500                 505                 510

Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe
        515                 520
```

<210> 73
<211> 2606
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類BSAP mRNA

<400> 73

ccgggcctca ctcgggcccc gcggccgcct ttataaggcg gcgggggtgg tggcccgggc
60

cgcgttgcgc tcccgccact ccgcgcccgc tatcctggct ccgtgctccc acgcgcttgt
120

gcctggacgg accctcgcca gtgctctgcg caggattgga acatcagtta acatctgacc
180

actgccagcc caccccctcc cacccacgtc gattgcatct ctgggctcca gggataaagc
240

aggtcttggg gtgcaccatg atttcaccat tcttagtact ggccattggc acctgcctta
300

ctaactcctt agtgccagag aaagagaaag accccaagta ctggcgagac caagcgcaag
360

agacactgaa atatgccctg gagcttcaga agctcaacac caacgtggct aagaatgtca
420

tcatgttcct gggagatggg atgggtgtct ccacagtgac ggctgcccgc atcctcaagg
480

gtcagctcca ccacaaccct ggggaggaga ccaggctgga gatggacaag ttccccttcg
540

tggccctctc caagacgtac aacaccaatg cccaggtccc tgacagcgcc ggcaccgcca
600

ccgcctacct gtgtggggtg aaggccaatg agggcaccgt gggggtaagc gcagccactg
660

agcgttcccg gtgcaacacc acccagggga acgaggtcac ctccatcctg cgctgggcca
720

aggacgctgg gaaatctgtg ggcattgtga ccaccacgag agtgaaccat gccacccca
780

gcgccgccta cgcccactcg gctgaccggg actggtactc agacaacgag atgccccctg
840

aggccttgag ccagggctgt aaggacatcg cctaccagct catgcataac atcagggaca
900

ttgacgtgat catgggggt ggccggaaat acatgtaccc caagaataaa actgatgtgg
960

agtatgagag tgacgagaaa gccaggggca cgaggctgga cggcctggac ctcgttgaca
1020

cctggaagag cttcaaaccg agatacaagc actcccactt catctggaac cgcacggaac
1080

tcctgaccct tgacccccac aatgtggact acctattggg tctcttcgag ccaggggaca
1140

tgcagtacga gctgaacagg aacaacgtga cggacccgtc actctccgag atggtggtgg
1200

tggccatcca gatcctgcgg aagaacccca aaggcttctt cttgctggtg gaaggaggca
1260

gaattgacca cgggcaccat gaaggaaaag ccaagcaggc cctgcatgag gcggtggaga
1320

tggaccgggc catcgggcag gcaggcagct tgacctcctc ggaagacact ctgaccgtgg
1380

tcactgcgga ccattcccac gtcttcacat ttggtggata cacccccgt ggcaactcta
1440

tctttggtct ggcccccatg ctgagtgaca cagacaagaa gcccttcact gccatcctgt
1500

atggcaatgg gcctggctac aaggtggtgg gcggtgaacg agagaatgtc tccatggtgg
1560

actatgctca caacaactac caggcgcagt ctgctgtgcc cctgcgccac gagacccacg
1620

gcggggagga cgtggccgtc ttctccaagg gccccatggc gcacctgctg cacggcgtcc
1680

acgagcagaa ctacgtcccc cacgtgatgg cgtatgcagc ctgcatcggg gccaacctcg
1740

gccactgtgc tcctgccagc tcggcaggca gccttgctgc aggcccccctg ctgctcgcgc
1800

tggccctcta ccccctgagc gtcctgttct gagggcccag ggcccgggca cccacaagcc
1860

cgtgacagat gccaacttcc cacacggcag ccccccccctc aaggggcagg gaggtggggg
1920

cctcctcagc ctctgcaact gcaagaaagg ggacccaaga aaccaaagtc tgccgcccac
1980

ctcgctcccc tctggaatct tccccaaggg ccaaacccac ttctggcctc cagcctttgc
2040

tccctccccg ctgcccttg gccaacaggg tagatttctc ttgggcaggc agagagtaca
2100

gactgcagac attctcaaag cctcttattt ttctagcgaa cgtatttctc cagacccaga
2160

ggccctgaag cctccgtgga acattctgga tctgaccctc ccagtctcat ctcctgaccc
2220

tcccactccc atctccttac ctctggaacc ccccaggccc tacaatgctc atgtccctgt
2280

ccccaggccc agccctcctt caggggagtt gaggtctttc tcctcaggac aaggccttgc
2340

tcactcactc actccaagac caccagggtc ccaggaagcc ggtgcctggg tggccatcct
2400

acccagcgtg gcccaggccg ggaagagcca cctggcaggg ctcacactcc tgggctctga
2460

acacacacgc cagctcctct ctgaagcgac tctcctgttt ggaacggcaa aaaaaaattt
2520

ttttttctct ttttggtggt ggttaaaagg gaacacaaaa catttaaata aaactttcca
2580

aatatttccg aggacaaaaa aaaaaa
2606

<210> 74
<211> 1722
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Snai1 mRNA

<400> 74
attcattgcg ccgcggcacg gcctagcgag tggttcttct gcgctactgc tgcgcgaatc
60

ggcgacccca gtgcctcgac cactatgccg cgctctttcc tcgtcaggaa gccctccgac
120

cccaatcgga agcctaacta cagcgagctg caggactcta atccagagtt taccttccag
180

cagccctacg accaggccca cctgctggca gccatcccac ctccggagat cctcaacccc
240

accgcctcgc tgccaatgct catctgggac tctgtcctgg cgccccaagc ccagccaatt
300

gcctgggcct cccttcggct ccaggagagt cccagggtgg cagagctgac ctccctgtca
360

gatgaggaca gtgggaaagg ctcccagccc cccagcccac cctcaccggc tccttcgtcc
420

ttctcctcta cttcagtctc ttccttggag gccgaggcct atgctgcctt cccaggcttg
480

ggccaagtgc ccaagcagct ggcccagctc tctgaggcca aggatctcca ggctcgaaag
540

gccttcaact gcaaatactg caacaaggaa tacctcagcc tgggtgccct caagatgcac
600

atccgaagcc acacgctgcc ctgcgtctgc ggaacctgcg ggaaggcctt ctctaggccc
660

tggctgctac aaggccatgt ccggacccac actggcgaga agcccttctc ctgtccccac
720

tgcagccgtg ccttcgctga ccgctccaac ctgcgggccc acctccagac ccactcagat
780

gtcaagaagt accagtgcca ggcgtgtgct cggaccttct cccgaatgtc cctgctccac
840

aagcaccaag agtccggctg ctcaggatgt ccccgctgac cctcgaggct ccctcttcct
900

ctccatacct gcccctgcct gacagccttc cccagctcca gcaggaagga ccccacatcc
960

ttctcactgc catggaattc cctcctgagt gccccacttc tggccacatc agccccacag
1020

gactttgatg aagaccattt tctggttctg tgtcctctgc ctgggctctg gaagaggcct
1080

tcccatggcc atttctgtgg agggagggca gctggccccc agccctgggg gattcctgag
1140

ctggcctgtc tgcgtgggtt tttgtatcca gagctgtttg gatacagctg ctttgagcta
1200

caggacaaag gctgacagac tcactgggaa gctcccaccc cactcagggg accccactcc
1260

cctcacacac acccccccac aaggaaccct caggccaccc tccacgaggt gtgactaact
1320

atgcaataat ccacccccag gtgcagcccc agggcctgcg gaggcggtgg cagactagag
1380

tctgagatgc cccgagccca ggcagctatt tcagcctcct gtttggtggg gtggcacctg
1440

tttcccgggc aatttaacaa tgtctgaaaa gggactgtga gtaatggctg tcacttgtcg
1500

ggggcccaag tggggtgctc tggtctgacc gatgtgtctc ccagaactat tctgggggcc
1560

cgacaggtgg gcctgggagg aagatgttta cattttaaa ggtacactgg tatttatatt
1620

tcaaacattt tgtatcaagg aaacgttttg tatagttata tgtacagttt attgatattc
1680

aataaagcag ttaatttata tattaaaaaa aaaaaaaaaa aa
1722

<210> 75
<211> 1815
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Dkk1 mRNA

<400> 75
gcagagctct gtgctccctg cagtcaggac tctgggaccg caggggctc ccggaccctg
60

actctgcagc cgaaccggca cggtttcgtg gggacccagg cttgcaaagt gacggtcatt
120

ttctctttct ttctccctct tgagtccttc tgagatgatg gctctgggcg cagcgggagc
180

tacccgggtc tttgtcgcga tggtagcggc ggctctcggc ggccaccctc tgctgggagt
240

gagcgccacc ttgaactcgg ttctcaattc caacgctatc aagaacctgc ccccaccgct
300

gggcggcgct gcggggcacc caggctctgc agtcagcgcc gcgccgggaa tcctgtaccc
360

gggcgggaat aagtaccaga ccattgacaa ctaccagccg tacccgtgcg cagaggacga
420

ggagtgcggc actgatgagt actgcgctag tcccacccgc ggaggggacg caggcgtgca
480

aatctgtctc gcctgcagga agcgccgaaa acgctgcatg cgtcacgcta tgtgctgccc
540

cgggaattac tgcaaaaatg gaatatgtgt gtcttctgat caaaatcatt tccgaggaga
600

aattgaggaa accatcactg aaagctttgg taatgatcat agcaccttgg atgggtattc
660

cagaagaacc accttgtctt caaaaatgta tcacaccaaa ggacaagaag gttctgtttg
720

tctccggtca tcagactgtg cctcaggatt gtgttgtgct agacacttct ggtccaagat
780

ctgtaaacct gtcctgaaag aaggtcaagt gtgtaccaag cataggagaa aaggctctca
840

tggactagaa atattccagc gttgttactg tggagaaggt ctgtcttgcc ggatacagaa
900

agatcaccat caagccagta attcttctag gcttcacact tgtcagagac actaaaccag
960

ctatccaaat gcagtgaact ccttttatat aatagatgct atgaaaacct tttatgacct
1020

tcatcaactc aatcctaagg atatacaagt tctgtggttt cagttaagca ttccaataac
1080

accttccaaa aacctggagt gtaagagctt tgtttcttta tggaactccc ctgtgattgc
1140

agtaaattac tgtattgtaa attctcagtg tggcacttac ctgtaaatgc aatgaaactt
1200

ttaattattt ttctaaaggt gctgcactgc ctatttttcc tcttgttatg taaatttttg
1260

tacacattga ttgttatctt gactgacaaa tattctatat tgaactgaag taaatcattt
1320

cagcttatag ttcttaaaag cataaccctt taccccattt aattctagag tctagaacgc
1380

aaggatctct tggaatgaca aatgataggt acctaaaatg taacatgaaa atactagctt
1440

attttctgaa atgtactatc ttaatgctta aattatattt ccctttaggc tgtgatagtt
1500

tttgaaataa aatttaacat ttaatatcat gaaatgttat aagtagacat acattttggg
1560

attgtgatct tagaggtttg tgtgtgtgta cgtatgtgtg tgttctacaa gaacggaagt
1620

gtgatatgtt taaagatgat cagagaaaag acagtgtcta aatataagac aatattgatc
1680

agctctagaa taactttaaa gaaagacgtg ttctgcattg ataaactcaa atgatcatgg
1740

cagaatgaga gtgaatctta cattactact ttcaaaaata gtttccaata aattaataat
1800

acctaaaaaa aaaaa
1815

<210> 76
<211> 5927
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Colla1 mRNA

<400> 76
tcgtcggagc agacgggagt ttctcctcgg ggtcggagca ggaggcacgc ggagtgtgag
60

gccacgcatg agcggacgct aacccccctcc ccagccacaa agagtctaca tgtctagggt
120

ctagacatgt tcagctttgt ggacctccgg ctcctgctcc tcttagcggc caccgccctc
180

ctgacgcacg gccaagagga aggccaagtc gagggccaag acgaagacat cccaccaatc
240

acctgcgtac agaacggcct caggtaccat gaccgagacg tgtggaaacc cgagccctgc
300

cggatctgcg tctgcgacaa cggcaaggtg ttgtgcgatg acgtgatctg tgacgagacc
360

aagaactgcc ccggcgccga agtccccgag ggcgagtgct gtcccgtctg ccccgacggc
420

tcagagtcac ccaccgacca agaaaccacc ggcgtcgagg gacccaaggg agacactggc
480

ccccgaggcc caaggggacc cgcaggcccc cctggccgag atggcatccc tggacagcct
540

ggacttcccg gacccccccgg acccccccgga cctcccggac cccctggcct cggaggaaac
600

tttgctcccc agctgtctta tggctatgat gagaaatcaa ccggaggaat ttccgtgcct
660

ggccccatgg gtccctctgg tcctcgtggt ctccctggcc cccctggtgc acctggtccc
720

caaggcttcc aaggtccccc tggtgagcct ggcgagcctg gagcttcagg tcccatgggt
780

ccccgaggtc ccccaggtcc ccctggaaag aatggagatg atggggaagc tggaaaacct
840

ggtcgtcctg gtgagcgtgg gcctcctggg cctcagggtg ctcgaggatt gcccggaaca
900

gctggcctcc ctggaatgaa gggacacaga ggtttcagtg gtttggatgg tgccaaggga
960

gatgctggtc ctgctggtcc taagggtgag cctggcagcc ctggtgaaaa tggagctcct
1020

ggtcagatgg gcccccgtgg cctgcctggt gagagaggtc gccctggagc ccctggccct
1080

gctggtgctc gtggaaatga tggtgctact ggtgctgccg ggcccccctgg tcccaccggc
1140

cccgctggtc ctcctggctt ccctggtgct gttggtgcta agggtgaagc tggtccccaa
1200

gggccccgag gctctgaagg tccccagggt gtgcgtggtg agcctggccc ccctggccct
1260

gctggtgctg ctggccctgc tggaaaccct ggtgctgatg gacagcctgg tgctaaaggt
1320

gccaatggtg ctcctggtat tgctggtgct cctggcttcc ctggtgcccg aggcccctct
1380

ggaccccagg gccccggcgg ccctcctggt cccaagggta acagcggtga acctggtgct
1440

cctggcagca aaggagacac tggtgctaag ggagagcctg gccctgttgg tgttcaagga
1500

ccccctggcc ctgctggaga ggaaggaaag cgaggagctc gaggtgaacc cggacccact
1560

ggcctgcccg gacccccctgg cgagcgtggt ggacctggta gccgtggttt ccctggcgca
1620

gatggtgttg ctggtcccaa gggtcccgct ggtgaacgtg gttctcctgg ccctgctggc
1680

cccaaaggat ctcctggtga agctggtcgt cccggtgaag ctggtctgcc tggtgccaag
1740

ggtctgactg gaagccctgg cagccctggt cctgatggca aaactggccc ccctggtccc
1800

gccggtcaag atggtcgccc cggaccccca ggcccacctg gtgcccgtgg tcaggctggt
1860

gtgatgggat tccctggacc taaaggtgct gctggagagc ccggcaaggc tggagagcga
1920

ggtgttcccg gacccccctgg cgctgtcggt cctgctggca aagatggaga ggctggagct
1980

cagggacccc ctggccctgc tggtcccgct ggcgagagag gtgaacaagg ccctgctggc
2040

tcccccggat tccagggtct ccctggtcct gctggtcctc caggtgaagc aggcaaacct
2100

ggtgaacagg gtgttcctgg agaccttggc gcccctggcc cctctggagc aagaggcgag
2160

agaggtttcc ctggcgagcg tggtgtgcaa ggtccccctg gtcctgctgg tccccgaggg
2220

gccaacggtg ctcccggcaa cgatggtgct aagggtgatg ctggtgcccc tggagctccc
2280

ggtagccagg gcgcccctgg ccttcaggga atgcctggtg aacgtggtgc agctggtctt
2340

ccagggccta agggtgacag aggtgatgct ggtcccaaag gtgctgatgg ctctcctggc
2400

aaagatggcg tccgtggtct gactggcccc attggtcctc ctggccctgc tggtgccccct
2460

ggtgacaagg gtgaaagtgg tcccagcggc cctgctggtc ccactggagc tcgtggtgcc
2520

cccggagacc gtggtgagcc tggtcccccc ggccctgctg gctttgctgg ccccctggt
2580

gctgacggcc aacctggtgc taaaggcgaa cctggtgatg ctggtgctaa aggcgatgct
2640

ggtccccctg gccctgccgg acccgctgga ccccctggcc ccattggtaa tgttggtgct
2700

cctggagcca aaggtgctcg cggcagcgct ggtccccctg gtgctactgg tttccctggt
2760

gctgctggcc gagtcggtcc tcctggcccc tctggaaatg ctggaccccc tggccctcct
2820

ggtcctgctg gcaaagaagg cggcaaaggt ccccgtggtg agactggccc tgctggacgt
2880

cctggtgaag ttggtccccc tggtcccccc ggccctgctg gcgagaaagg atcccctggt
2940

gctgatggtc ctgctggtgc tcctggtact cccgggcctc aaggtattgc tggacagcgt
3000

ggtgtggtcg gcctgcctgg tcagagagga gagagaggct tccctggtct tcctggcccc
3060

tctggtgaac ctggcaaaca aggtccctct ggagcaagtg gtgaacgtgg tccccctggt
3120

cccatgggcc cccctggatt ggctggaccc cctggtgaat ctggacgtga gggggctcct
3180

ggtgccgaag gttcccctgg acgagacggt tctcctggcg ccaagggtga ccgtggtgag
3240

accggccccg ctggaccccc tggtgctcct ggtgctcctg gtgccctgg ccccgttggc
3300

cctgctggca agagtggtga tcgtggtgag actggtcctg ctggtcccgc cggtcctgtc
3360

ggccctgttg gcgcccgtgg ccccgccgga ccccaaggcc cccgtggtga caagggtgag
3420

acaggcgaac agggcgacag aggcataaag ggtcaccgtg gcttctctgg cctccagggt
3480

ccccctggcc ctcctggctc tcctggtgaa caaggtccct ctggagcctc tggtcctgct
3540

ggtccccgag gtcccccctgg ctctgctggt gctcctggca aagatggact caacggtctc
3600

cctggcccca ttgggccccc tggtcctcgc ggtcgcactg gtgatgctgg tcctgttggt
3660

ccccccggcc ctcctggacc tcctggtccc cctggtcctc ccagcgctgg tttcgacttc
3720

agcttcctgc cccagccacc tcaagagaag gctcacgatg gtggccgcta ctaccgggct
3780

gatgatgcca atgtggttcg tgaccgtgac ctcgaggtgg acaccaccct caagagcctg
3840

agccagcaga tcgagaacat ccggagccca gagggcagcc gcaagaaccc cgcccgcacc
3900

tgccgtgacc tcaagatgtg ccactctgac tggaagagtg gagagtactg gattgacccc
3960

aaccaaggct gcaacctgga tgccatcaaa gtcttctgca acatggagac tggtgagacc
4020

tgcgtgtacc ccactcagcc cagtgtggcc cagaagaact ggtacatcag caagaacccc
4080

aaggacaaga ggcatgtctg gttcggcgag agcatgaccg atggattcca gttcgagtat
4140

ggcggccagg gctccgaccc tgccgatgtg gccatccagc tgaccttcct gcgcctgatg
4200

tccaccgagg cctcccagaa catcacctac cactgcaaga acagcgtggc ctacatggac
4260

cagcagactg gcaacctcaa gaaggccctg ctcctccagg gctccaacga gatcgagatc
4320

cgcgccgagg gcaacagccg cttcacctac agcgtcactg tcgatggctg cacgagtcac
4380

accggagcct ggggcaagac agtgattgaa tacaaaacca ccaagacctc ccgcctgccc
4440

atcatcgatg tggccccctt ggacgttggt gccccagacc aggaattcgg cttcgacgtt
4500

ggccctgtct gcttcctgta aactccctcc atcccaacct ggctccctcc cacccaacca
4560

actttccccc caacccggaa acagacaagc aacccaaact gaacccccctc aaaagccaaa
4620

aaatgggaga caatttcaca tggactttgg aaaatatttt tttcctttgc attcatctct
4680

caaacttagt ttttatcttt gaccaaccga acatgaccaa aaaccaaaag tgcattcaac
4740

cttaccaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaata aataaataac tttttaaaaa aggaagcttg
4800

gtccacttgc ttgaagaccc atgcgggggt aagtcccttt ctgcccgttg ggcttatgaa
4860

accccaatgc tgccctttct gctcctttct ccacaccccc cttggggcct cccctccact
4920

ccttcccaaa tctgtctccc cagaagacac aggaaacaat gtattgtctg cccagcaatc
4980

aaaggcaatg ctcaaacacc caagtggccc ccaccctcag cccgctcctg cccgcccagc
5040

accccccaggc cctgggggac ctggggttct cagactgcca aagaagcctt gccatctggc
5100

gctcccatgg ctcttgcaac atctcccctt cgtttttgag ggggtcatgc cgggggagcc
5160

accagcccct cactgggttc ggaggagagt caggaagggc cacgacaaag cagaaacatc
5220

ggatttgggg aacgcgtgtc aatcccttgt gccgcagggc tgggcgggag agactgttct
5280

gttccttgtg taactgtgtt gctgaaagac tacctcgttc ttgtcttgat gtgtcaccgg
5340

ggcaactgcc tgggggcggg gatgggggca gggtggaagc ggctccccat tttataccaa
5400

aggtgctaca tctatgtgat gggtggggtg gggagggaat cactggtgct atagaaattg
5460

agatgccccc ccaggccagc aaatgttcct ttttgttcaa agtctatttt tattccttga
5520

tatttttctt ttttttttt ttttttgtg gatggggact tgtgaatttt tctaaaggtg
5580

ctatttaaca tgggaggaga gcgtgtgcgg ctccagccca gcccgctgct cactttccac
5640

cctctctcca cctgcctctg gcttctcagg cctctgctct ccgacctctc tcctctgaaa
5700

ccctcctcca cagctgcagc ccatcctccc ggctccctcc tagtctgtcc tgcgtcctct
5760

gtccccgggt ttcagagaca acttcccaaa gcacaaagca gtttttcccc ctaggggtgg
5820

gaggaagcaa aagactctgt acctattttg tatgtgtata ataatttgag atgtttttaa
5880

ttattttgat tgctggaata aagcatgtgg aaatgaccca aacataa
5927

<210> 77
<211> 1203
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 活化素A mRNA

<400> 77
atgcccttgc tttggctgag aggatttctg ttggcaagtt gctggattat agtgaggagt
60

tcccccaccc caggatccga ggggcacagc gcggcccccg actgtccgtc ctgtgcgctg
120

gccgccctcc caaaggatgt acccaactct cagccagaga tggtggaggc cgtcaagaag
180

cacattttaa acatgctgca cttgaagaag agacccgatg tcacccagcc ggtacccaag
240

gcggcgcttc tgaacgcgat cagaaagctt catgtgggca aagtcgggga gaacgggtat
300

gtggagatag aggatgacat tggaaggagg gcagaaatga atgaacttat ggagcagacc
360

tcggagatca tcacgtttgc cgagtcaggt tggtgctggc attggcaggg ggtggggagg
420

ggtgggggggt gggagggtaa aatatatttc tttgacagtc ccaggaggaa cttcttttcc
480

cttcagctgg aaactgcctg ggaaggttat tagttattag gtgatggtag cggactagcc
540

gacggagggc aggcagggga gggggagagg actttacaga aaaggaattc tcggtcgagc
600

tctgcctgga gatgactggc ttacacttac taaacccagc gggtcacaca gagaggaagc
660

tcggggccaa tgttgagctg gaaggcagac tgtgaggggc tgccttgccc tgcctgtgaa
720

acagatctga gcagccggag gaaagccgcg gcattttcgg gtgctagggg agcagaggag
780

gcttccggac cccatccaag tttttattga gggtagaggg gtgaatgtac caggattgga
840

gtggaatggc acagatgaag tcactctctt aaaacaaacc ttccccttta aaagtccaat
900

ctggggccac attggagaag cagggcatat ttatgagtga cagtcatttt tacctttaga
960

aaatgtctat aagtgcacag gcaccacatt caagacaggg aagagctact ttgggggaca
1020

gttgtcattg aaccagcagt tacttttggg acactgactt ttgctctctg aaagaaaaaa
1080

aaataaataa aacaaccagt tttgttcttt ctaaagttac taagagctct ctgccaagga
1140

acgaaccttg acaaagtact ctcagatact acgctgaagt cactcaatct taagaggaag
1200

aag
1203

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Snail引子1

<400> 78
tcggaagcct aactacagcg a
21

<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Snail引子2

<400> 79
agatgagcat tggcagcgag
20

<210> 80
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Dkk1引子1

<400> 80
ccttgaactc ggttctcaat tcc
23

<210> 81
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Dkk1引子2

<400> 81
caatggtctg gtacttattc ccg
23

<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Colla1引子1

<400> 82
gagggccaag acgaagacat c
21

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Colla1引子2

<400> 83
cagatcacgt catcgcacaa c
21

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 活化素引子1

<400> 84
tcatcacgtt tgccgagtca
20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 活化素引子2

<400> 85
gctagtccgc taccatcacc
20

<210> 86
<211> 4241
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人類Axin2 mRNA

<400> 86
actggctccg cgagcctggc ccgggggagt cggctggagc cggctgcgct ttgataaggt
60

cctggcaact cagtaacagc ccgagagccg ggaaataaaa ataacccctc agagcgatgg
120

atttcggggc cgcccggcgg ccgaggcgcc cgccgaaggc cctgctgtaa aagagaggag
180

gttcagatga gcccctgctg acttgagaga gacagagaga ccacgccgat tgctgagagg
240

aactggaaga agaaaaattc ccagactcag tgggaagagc tccctcacca tgagtagcgc
300

tatgttggtg acttgcctcc cggaccccag cagcagcttc cgtgaggatg ccccgcggcc
360

cccagtgcca ggggaagaag gggagacccc accgtgtcag ccaggggtgg gcaagggcca
420

ggtcaccaaa cccatgcctg tctcttccaa caccaggcgg aacgaagatg ggttggggga
480

gccggagggg cgggcatctc cggattcccc tctgacccgg tggaccaagt ccttacactc
540

cttattgggc gatcaagacg gtgcttacct gttccgaact ttcctggaga gggagaaatg
600

cgtggatacc ttagacttct ggtttgcctg caatggattc aggcagatga acctgaagga
660

taccaaaact ttacgagtag ccaaagcgat ctacaaaagg tacattgaga acaacagcat
720

tgtctccaag cagctgaagc ctgccaccaa gacctacata agagatggca tcaagaagca
780

gcagattgat tccatcatgt ttgaccaggc gcagaccgag atccagtcgg tgatggagga
840

aaatgcctac cagatgtttt tgacttctga tatatacctc gaatatgtga ggagtggggg
900

agaaaacaca gcttacatga gtaatggggg actcgggagc ctaaaggtcg tgtgtggcta
960

tctccccacc ttgaatgaag aagaggagtg gacttgtgcc gacttcaagt gcaaactttc
1020

gccaaccgtg gttggcttgt ccagcaaaac tctgagggcc acggcgagtg tgaggtccac
1080

ggaaactgtt gacagtggat acaggtcctt caagaggagc gatcctgtta atccttatca
1140

cataggttct ggctatgtct ttgcaccagc caccagcgcc aacgacagtg agatatccag
1200

tgatgcgctg acggatgatt ccatgtccat gacggacagc agtgtagatg gaattcctcc
1260

ttatcgtgtg ggcagtaaga aacagctcca gagagaaatg catcgcagtg tgaaggccaa
1320

tggccaagtg tctctacctc atttcccgag aacccaccgc ctgcccaagg agatgacccc
1380

cgtggaaccc gccacctttg cagctgagct gatctcgagg ctggaaaagc tgaagctgga
1440

gttggagagc cgccacagcc tggaggagcg cctgcagcag atccgagagg atgaagagag
1500

agagggctcc gagctcacac tcaattcgcg ggaggggggcg cccacgcagc acccccctctc
1560

cctactgccc tccggcagct acgaggaaga cccgcagacg atactggacg atcacctgtc
1620

cagggtcctc aagacccctg gctgccagtc tccaggcgta ggccgctata gccccccgctc
1680

ccgctccccg gaccaccacc accaccacca ttcgcagtac cactccctgc tcccgcccgg
1740

tggcaagctg cctcccgcgg ccgcctcgcc gggcgcctgc cccctcctcg ggggcaaagg
1800

ctttgtgacc aagcagacga cgaagcatgt ccaccaccac tacatccacc accatgccgt
1860

ccccaagacc aaggaggaga tcgaggcgga ggccacgcag cgggtgcact gcttctgccc
1920

tgggggcagc gagtattact gctactcgaa atgcaaaagc cactccaagg ctccggaaac
1980

catgcccagc gagcagtttg gcggcagcag aggcagtacc ttgcccaaac gcaatgggaa
2040

aggcacggag ccgggcctgg ccctgcccgc cagggaagga ggggcccccg gcggagctgg
2100

ggccctgcag cttccccggg aggaaggaga caggtcgcag gatgtctggc agtggatgct
2160

ggagagtgag cggcagagca agcccaagcc ccatagtgcc caaagcacaa aaaaggccta
2220

ccccttggag tctgcccgct cgtctccagg cgaacgagcc agccggcacc atctgtgggg
2280

gggcaacagc gggcaccccc gcaccacccc ccgtgcccac ctgttcaccc aggaccctgc
2340

gatgcctccc ctgaccccac ccaacacgct ggctcagctg gaggaggcct gtcgcaggct
2400

agctgaggtg tcgaagcccc caaagcagcg gtgctgtgtg gccagtcagc agagggacag
2460

gaatcattcg gccactgttc agacgggagc cacacccttc tccaatccaa gcctggctcc
2520

agaagatcac aaagagccaa agaaactggc aggtgtccac gcgctccagg ccagtgagtt
2580

ggttgtcact tacttttct gtggggaaga aattccatac cggaggatgc tgaaggctca
2640

gagcttgacc ctgggccact ttaaagagca gctcagcaaa aagggaaatt ataggtatta
2700

cttcaaaaaa gcaagcgatg agtttgcctg tggagcggtg tttgaggaga tctgggagga
2760

tgagacggtg ctcccgatgt atgaaggccg gattctgggc aaagtggagc ggatcgattg
2820

agccctgggg tctggctttg gtgaactgtt ggagcccgaa gctcttgtga actgtcttgg
2880

ctgtgagcaa ctgcgacaaa acattttgaa ggaaaattaa accaatgaag aagacaaagt
2940

ctaaggaaga atcggccagt gggccttcgg gagggcgggg ggaggttgat tttcatgatt
3000

catgagctgg gtactgactg agataagaaa agcctgaact atttattaaa aacatgacca
3060

ctcttggcta ttgaagatgc tgcctgtatt tgagagactg ccatacataa tatatgactt
3120

cctagggatc tgaaatccat aaactaagag aaactgtgta tagcttacct gaacaggaat
3180

ccttactgat atttatagaa cagttgattt cccccatccc cagtttatgg atatgctgct
3240

ttaaacttgg aaggggggaga caggaagttt taattgttct gactaaactt aggagttgag
3300

ctaggagtgc gttcatggtt tcttcactaa cagaggaatt atgctttgca ctacgtccct
3360

ccaagtgaag acagactgtt ttagacagac tttttaaaat ggtgccctac cattgacaca
3420

tgcagaaatt ggtgcgtttt gttttttttt ttcctatgct gctctgtttt gtcttaaagg
3480

tcttgagggt tgaccatgtt gcgtcatcat caacattttg ggggttgtgt tggatgggat
3540

gatctgttgc agagggagag gcagggaacc ctgctccttc gggccccagg ttgatcctgt
3600

gactgaggct ccccctcatg tagcctcccc aggcccaggg ccctgaggcc tgctagaatc
3660

actgccgctg tgctttcgtg gaaatgacag ttccttgttt tttttgtttc tgtttttgtt
3720

ttacattagt cattggacca cagccattca ggaactaccc cctgccccac aaagaaatga
3780

acagttgtag ggagacccag cagcaccttt cctccacaca ccttcatttt gatgttcggg
3840

tttttgtgtt aagttaatct gtacattctg tttgccattg ttacttgtac tatacatctg
3900

tatatagtgt acggcaaaag agtattaatc cactatctct agtgcttgac tttaaatcag
3960

tacagtacct gtacctgcac ggtcacccgc tccgtgtgtc gccctatatt gagggctcaa
4020

gctttccctt gtttttttgaa aggggtttat gtataaatat attttatgcc tttttattac
4080

aagtcttgta ctcaatgact tttgtcatga cattttgttc tacttatact gtaaattatg
4140

cattataaag agttcattta aggaaaatta cttggtacaa taattattgt aattaagaga
4200

tgtagccttt attaaaattt tatatttttc aaaaaaaaaa a
4241

<210> 87
<211> 843
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類Axin2胺基酸序列

<400> 87

Met Ser Ser Ala Met Leu Val Thr Cys Leu Pro Asp Pro Ser Ser Ser
1 5 10 15

Phe Arg Glu Asp Ala Pro Arg Pro Pro Val Pro Gly Glu Glu Gly Glu
20 25 30

Thr Pro Pro Cys Gln Pro Gly Val Gly Lys Gly Gln Val Thr Lys Pro
35 40 45

Met Pro Val Ser Ser Asn Thr Arg Arg Asn Glu Asp Gly Leu Gly Glu
50 55 60

Pro Glu Gly Arg Ala Ser Pro Asp Ser Pro Leu Thr Arg Trp Thr Lys
65 70 75 80

Ser Leu His Ser Leu Leu Gly Asp Gln Asp Gly Ala Tyr Leu Phe Arg
85 90 95

Thr Phe Leu Glu Arg Glu Lys Cys Val Asp Thr Leu Asp Phe Trp Phe
100 105 110

```
Ala Cys Asn Gly Phe Arg Gln Met Asn Leu Lys Asp Thr Lys Thr Leu
        115                 120                 125

Arg Val Ala Lys Ala Ile Tyr Lys Arg Tyr Ile Glu Asn Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Val Ser Lys Gln Leu Lys Pro Ala Thr Lys Thr Tyr Ile Arg Asp Gly
145                 150                 155                 160

Ile Lys Lys Gln Gln Ile Asp Ser Ile Met Phe Asp Gln Ala Gln Thr
                165                 170                 175

Glu Ile Gln Ser Val Met Glu Glu Asn Ala Tyr Gln Met Phe Leu Thr
            180                 185                 190

Ser Asp Ile Tyr Leu Glu Tyr Val Arg Ser Gly Gly Glu Asn Thr Ala
        195                 200                 205

Tyr Met Ser Asn Gly Gly Leu Gly Ser Leu Lys Val Val Cys Gly Tyr
    210                 215                 220

Leu Pro Thr Leu Asn Glu Glu Glu Glu Trp Thr Cys Ala Asp Phe Lys
225                 230                 235                 240

Cys Lys Leu Ser Pro Thr Val Val Gly Leu Ser Ser Lys Thr Leu Arg
                245                 250                 255

Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Glu Thr Val Asp Ser Gly Tyr Arg
            260                 265                 270

Ser Phe Lys Arg Ser Asp Pro Val Asn Pro Tyr His Ile Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Tyr Val Phe Ala Pro Ala Thr Ser Ala Asn Asp Ser Glu Ile Ser Ser
    290                 295                 300

Asp Ala Leu Thr Asp Asp Ser Met Ser Met Thr Asp Ser Ser Val Asp
305                 310                 315                 320

Gly Ile Pro Pro Tyr Arg Val Gly Ser Lys Lys Gln Leu Gln Arg Glu
                325                 330                 335
```

```
Met His Arg Ser Val Lys Ala Asn Gly Gln Val Ser Leu Pro His Phe
            340                 345                 350

Pro Arg Thr His Arg Leu Pro Lys Glu Met Thr Pro Val Glu Pro Ala
        355                 360                 365

Thr Phe Ala Ala Glu Leu Ile Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys Leu Glu
    370                 375                 380

Leu Glu Ser Arg His Ser Leu Glu Glu Arg Leu Gln Gln Ile Arg Glu
385                 390                 395                 400

Asp Glu Glu Arg Glu Gly Ser Glu Leu Thr Leu Asn Ser Arg Glu Gly
                405                 410                 415

Ala Pro Thr Gln His Pro Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Ser Tyr Glu
            420                 425                 430

Glu Asp Pro Gln Thr Ile Leu Asp Asp His Leu Ser Arg Val Leu Lys
        435                 440                 445

Thr Pro Gly Cys Gln Ser Pro Gly Val Gly Arg Tyr Ser Pro Arg Ser
    450                 455                 460

Arg Ser Pro Asp His His His His His His Ser Gln Tyr His Ser Leu
465                 470                 475                 480

Leu Pro Pro Gly Gly Lys Leu Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gly Ala
                485                 490                 495

Cys Pro Leu Leu Gly Gly Lys Gly Phe Val Thr Lys Gln Thr Thr Lys
            500                 505                 510

His Val His His His Tyr Ile His His His Ala Val Pro Lys Thr Lys
        515                 520                 525

Glu Glu Ile Glu Ala Glu Ala Thr Gln Arg Val His Cys Phe Cys Pro
    530                 535                 540
```

Gly Gly Ser Glu Tyr Tyr Cys Tyr Ser Lys Cys Lys Ser His Ser Lys
545 550 555 560

Ala Pro Glu Thr Met Pro Ser Glu Gln Phe Gly Gly Ser Arg Gly Ser
565 570 575

Thr Leu Pro Lys Arg Asn Gly Lys Gly Thr Glu Pro Gly Leu Ala Leu
580 585 590

Pro Ala Arg Glu Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ala Gly Ala Leu Gln Leu
595 600 605

Pro Arg Glu Glu Gly Asp Arg Ser Gln Asp Val Trp Gln Trp Met Leu
610 615 620

Glu Ser Glu Arg Gln Ser Lys Pro Lys Pro His Ser Ala Gln Ser Thr
625 630 635 640

Lys Lys Ala Tyr Pro Leu Glu Ser Ala Arg Ser Ser Pro Gly Glu Arg
645 650 655

Ala Ser Arg His His Leu Trp Gly Gly Asn Ser Gly His Pro Arg Thr
660 665 670

Thr Pro Arg Ala His Leu Phe Thr Gln Asp Pro Ala Met Pro Pro Leu
675 680 685

Thr Pro Pro Asn Thr Leu Ala Gln Leu Glu Glu Ala Cys Arg Arg Leu
690 695 700

Ala Glu Val Ser Lys Pro Pro Lys Gln Arg Cys Cys Val Ala Ser Gln
705 710 715 720

Gln Arg Asp Arg Asn His Ser Ala Thr Val Gln Thr Gly Ala Thr Pro
725 730 735

Phe Ser Asn Pro Ser Leu Ala Pro Glu Asp His Lys Glu Pro Lys Lys
740 745 750

Leu Ala Gly Val His Ala Leu Gln Ala Ser Glu Leu Val Val Thr Tyr
755 760 765

```
Phe Phe Cys Gly Glu Glu Ile Pro Tyr Arg Arg Met Leu Lys Ala Gln
    770                 775                 780

Ser Leu Thr Leu Gly His Phe Lys Glu Gln Leu Ser Lys Lys Gly Asn
785                 790                 795                 800

Tyr Arg Tyr Tyr Phe Lys Lys Ala Ser Asp Glu Phe Ala Cys Gly Ala
                805                 810                 815

Val Phe Glu Glu Ile Trp Glu Asp Glu Thr Val Leu Pro Met Tyr Glu
            820                 825                 830

Gly Arg Ile Leu Gly Lys Val Glu Arg Ile Asp
        835                 840
```

201625288

發明摘要

※ 申請案號：104133976

※ 申請日：104. 10. -8

※IPC 分類：

A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

【發明名稱】

使用ACTRII配位體捕捉以治療心血管疾病

TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE USING ACTRII LIGAND TRAPS

【中文】

本文提供用活化素II型受體信號傳導抑制劑治療個體之與血管鈣化相關之疾病及/或心血管疾病之方法，其藉由使用生物標記之水準作為該個體對該治療之反應、該治療之功效或該治療之合適劑量的指示。本文提供用活化素II型受體信號傳導抑制劑在個體中骨骼再吸收之方法，其藉由使用生物標記之水準作為該個體對該治療之反應、該治療之功效或該治療之合適劑量的指示。

【英文】

Provided herein are methods of treating diseases associated with vascular calcification and/or cardiovascular disease in a subject by using the level of a biomarker as an indicator(s) of responsiveness of the subject to the treatment, efficacy of the treatment, or appropriate dosage for the treatment with an activin type II receptor signaling inhibitor. Provided herein are methods of bone resorption in a subject by using the level of a biomarker as an indicator(s) of responsiveness of the subject to the treatment, efficacy of the treatment, or appropriate dosage for the treatment with an activin type II receptor signaling inhibitor.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（4）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之II型活化素受體(ActRII)信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之倫特相關轉錄因子2 (runt-related transcription factor 2，Runx2)水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之鹼性磷酸酶(Alp)水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之蝸牛同源物1 (Snail)水準相比，升高之Snail水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2 (phosphosmad2)水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之迪科科普夫(dickkopf)同源物1 (Dkk1)水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之1型α 1膠原蛋白(col1a1)水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之骨特異性鹼性磷酸酶(BSAP)水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯(Osterix)水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索(Klotho)水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α平滑肌肌動蛋白(α-SMA)水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之心肌素(MYOCD)水準相比，降低之MYOCD水準；

(n)與參考群體之平滑肌蛋白22-α (Sm22-α)水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3 (phosphosmad3)水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

2. 一種治療及/或預防個體中血管鈣化之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snai1水準相比，升高之Snai1水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

3. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；及/或

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準；及

其中該心血管疾病與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起。

4. 一種治療及/或預防個體中動脈硬度水準升高之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；及/或

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3

水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

5. 一種治療及/或預防個體之心血管疾病之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snai1水準相比，升高之Snai1水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；及/或

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準，

其中該心血管疾病與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起。

6. 一種治療及/或預防個體中左心室肥大(left ventricular hypertrophy；LVH)之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；及/或

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

7. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snai1水準相比，升高之Snai1水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；及/或

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準；

其中該心血管疾病與左心室肥大相關及/或由左心室肥大引

起。

8. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；及/或

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準；及

其中該心血管疾病與腎病相關及/或由腎病引起。

9. 一種減少個體中骨骼再吸收之方法，其包含向該個體投與醫藥學上有效劑量之ActRII信號傳導抑制劑，其中該個體具有：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，升高之Runx2水準；

(b)與參考群體之Alp水準相比，升高之Alp水準；

(c)與參考群體之Snail水準相比，升高之Snail水準；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，升高之磷酸化smad2水準；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，升高之Dkk1水準；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，升高之col1a1水準；

(g)與參考群體之活化素水準相比，升高之活化素水準；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，升高之BSAP水準；

(i)與參考群體之CTX水準相比，升高之CTX水準；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，升高之奧斯特里克斯水準；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，降低之克羅索水準；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，降低之α-SMA水準；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，降低之MYOCD水準；

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，降低之Sm22-α水準；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，升高之磷酸化smad3水準；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，升高之尿蛋白水準；及/或

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，降低之ActRIIA水準。

10. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該ActRII信號傳導抑制劑之該醫藥學上有效劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg或約1 g或約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5

mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg。

11. 如請求項1至10中任一項之方法，其中該醫藥學上有效劑量經由注射投與。

12. 如請求項1至11中任一項之方法，其中該醫藥學上有效劑量(i)每14天投與一次；(ii)每21天投與一次；(iii)每28天投與一次，或(iv)每42天投與一次。

13. 如請求項1至11中任一項之方法，其中該醫藥學上有效劑量連續及/或不確定性地投與。

14. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該等升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準分別比該參考群體之該等Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%。

15. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該等升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準等於該參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之該等Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準或比該等水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%。

16. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該等降低之克羅索、α-

SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準分別比該參考群體之該等克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

17. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該等降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準等於該參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之該等克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準或比該等水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

18. 一種治療及/或預防個體中血管鈣化之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該血管鈣化。

19. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包

含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

20. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該心血管疾病與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起，其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

21. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該心血管疾病與腎病相關及/或由腎病引起；且其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

22. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該心血管疾病與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起；且其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

23. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snai1、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該心血管疾病與左心室肥大相關及/或由左心室肥大引起；且其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

24. 一種減少個體中骨骼再吸收之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該第一量測值在該治療開始之前或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此減少該骨骼再吸收。

25. 一種治療及/或預防個體中血管鈣化之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、colla1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或

Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該血管鈣化。

26. 一種治療及/或預防個體中升高之動脈硬度水準之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該等升高之動脈硬度水準。

27. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該心血管疾病與動脈硬度水準升高相關及/或由動脈硬度水準升高引起，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

28. 一種治療及/或預防個體中左心室肥大(LVH)之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之

間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該LVH。

29. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該心血管疾病與左心室肥大相關及/或由左心室肥大引起，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

30. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、

ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

31. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑；

其中該心血管疾病與血管鈣化相關及/或由血管鈣化引起，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

32. 一種治療及/或預防個體中心血管疾病之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或

Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、collal、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑；

其中該心血管疾病與腎病相關及/或由腎病引起，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此治療及/或預防該心血管疾病。

33. 一種減少個體中骨骼再吸收之方法，其中該方法包含：

(a)向該個體投與初始劑量之ActRII信號傳導抑制劑；

(b)獲取該個體之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、collal、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第一量測值；

(c)在一段時間之後，獲取該個體之該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、collal、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準之第二量測值；及

(d)向該個體投與經調整劑量之該II型活化素受體信號傳導抑制劑，且其中該經調整劑量係基於該第一量測值與該第二量測值之間偵測到的變化，藉此減少該骨骼再吸收。

34. 如請求項18至33中任一項之方法，其中該ActRII信號傳導抑制劑之該初始劑量為約15 mg、約30 mg、約45 mg、約60 mg、約75 mg、約90 mg或約1 g或約0.1 mg/kg、約0.13 mg/kg、約0.2

mg/kg、約0.26 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg或約1.5 mg/kg。

35. 如請求項18至34中任一項之方法，其中該初始劑量經由注射投與。

36. 如請求項18至35中任一項之方法，其中該初始劑量(i)每14天投與一次；(ii)每21天投與一次，(iii)每28天投與一次；或(iv)每42天投與一次。

37. 如請求項18至35中任一項之方法，其中若出現以下情況，則該ActRII信號傳導抑制劑之該經調整劑量高於該初始劑量：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，該Runx2水準升高；

(b)與參考群體之Alp水準相比，該Alp水準升高；

(c)與參考群體之Snai1水準相比，該Snai1水準升高；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，該磷酸化smad2水準升高；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，該Dkk1水準升高；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，該col1a1水準升高；

(g)與參考群體之活化素水準相比，該活化素水準升高；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，該BSAP水準升高；

(i)與參考群體之CTX水準相比，該CTX水準升高；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，該奧斯特里克斯水準升高；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，該克羅索水準降低；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，該α-SMA水準降低；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，該MYOCD水準降低；

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，該Sm22-α水準降低；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，該磷酸化smad3水準升高；

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，該尿蛋白水準升高；

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，該ActRIIA水準降低；及/或

(r)與參考群體之Axin2水準相比，該Axin2水準降低。

38. 如請求項37之方法，其中該經調整劑量比該初始劑量高約2.5 mg、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg或約35 mg，或比該初始劑量高約0.05 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.15 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.35 mg/kg、約0.4 mg/kg或約0.5 mg/kg。

39. 如請求項37或38之方法，其中該經調整劑量比該初始劑量更頻繁地投與。

40. 如請求項18至39中任一項之方法，其中該經調整劑量每5、10、15、20、25、28、30、35或40天投與。

41. 如請求項18至33中任一項之方法，其中若出現以下情況，則該ActRII信號傳導抑制劑之該經調整劑量低於該初始劑量：

(a)與參考群體之Runx2水準相比，該Runx2水準降低；

(b)與參考群體之Alp水準相比，該Alp水準降低；

(c)與參考群體之Snai1水準相比，該Snai1水準降低；

(d)與參考群體之磷酸化smad2水準相比，該磷酸化smad2水準降低；

(e)與參考群體之Dkk1水準相比，該Dkk1水準降低；

(f)與參考群體之col1a1水準相比，該col1a1水準降低；

(g)與參考群體之活化素水準相比，該活化素水準降低；

(h)與參考群體之BSAP水準相比，該BSAP水準降低；

(i)與參考群體之CTX水準相比，該CTX水準降低；

(j)與參考群體之奧斯特里克斯水準相比，該奧斯特里克斯水準降低；

(k)與參考群體之克羅索水準相比，該克羅索水準升高；

(l)與參考群體之α-SMA水準相比，該α-SMA水準升高；

(m)與參考群體之MYOCD水準相比，該克羅索水準升高；

(n)與參考群體之Sm22-α水準相比，該Sm22-α水準升高；

(o)與參考群體之磷酸化smad3水準相比，該磷酸化smad3水準降低；及/或

(p)與參考群體之尿蛋白水準相比，該尿蛋白水準降低；

(q)與參考群體之ActRIIA水準相比，該ActRIIA水準升高；及/或

(r)與參考群體之Axin2水準相比，該Axin2水準升高。

42. 如請求項41之方法，其中該經調整劑量比該初始劑量低約2.5 mg、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg或約35 mg，或比該初始劑量低約0.05 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.15 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.35 mg/kg、約0.4 mg/kg或約0.5 mg/kg。

43. 如請求項41或42之方法，其中該經調整劑量比該初始劑量較不頻繁地投與。

44. 如請求項41至43中任一項之方法，其中該經調整劑量每30、35、40、42、50、60、70、80或90天投與。

45. 如請求項18至44中任一項之方法，其中該經調整劑量連續及/或不確定性地投與。

46. 如請求項18至44中任一項之方法，其中該第一量測值在該治療

開始之前獲取。

47. 如請求項18至44中任一項之方法，其中該第一量測值在該治療開始之後立即獲取或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、3週、4週或2個月內獲取。

48. 如請求項18至44中任一項之方法，其中該第二量測值在該治療開始之後立即獲取或在其至多1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週、2週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月內獲取。

49. 如請求項37之方法，其中

(a)該等升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準分別比該參考群體之該等Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或

(b)該等降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別比參考群體之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

50. 如請求項49之方法，其中

(a)該等升高之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準等於該參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之該等Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、coll a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧

斯特里克斯水準或比該等水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或

(b)該等降低之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準等於該參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之該等克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準或比該等水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

51. 如請求項41之方法，其中

(a)該等升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別比該參考群體之該等克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%或500%；及/或

(b)該等降低之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、collal、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準分別比參考群體之該等Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、collal、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

52. 如請求項51之方法，其中

(a)該等升高之克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準等於該參考群體中之前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%之該等克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準或比該等水準高約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%

或500%；及/或

(b)該等降低之Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準等於該參考群體中之後10%、後5%、後4%、後3%、後2%或後1%之該等Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX及/或奧斯特里克斯水準或比該等水準低約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

53. 如請求項1至17中任一項之方法，其中該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別為Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之蛋白質水準。

54. 如請求項18至52中任一項之方法，其中該Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別為Snail、磷酸化smad2、磷酸化smad3、尿蛋白、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之蛋白質水準。

55. 如請求項53或54之方法，其中該蛋白質水準藉由酶聯結免疫吸附劑分析法(enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA)測定。

56. 如請求項55之方法，其中該ELISA用以下進行

(a)用以測定Runx2水準之Runx2特異性抗體SC-390715 (Santa

Cruz)；

(b)用以測定Alp水準之Alp特異性抗體SC-98652 (Santa Cruz)；

(c)用以測定Snail水準之Snail特異性抗體sc-393172 (Santa Cruz)；

(d)用以測定磷酸化smad2水準之磷酸化smad2特異性抗體sc-101801 (Santa Cruz)；

(e)用以測定磷酸化smad3水準之磷酸化smad3特異性抗體sc-130218 (Santa Cruz)；

(f)用以測定Dkk1水準之Dkk1特異性抗體sc-374574 (Santa Cruz)；

(g)用以測定col1a1水準之Col1a1特異性抗體sc-8784 (Santa Cruz)；

(h)用以測定活化素水準之活化素特異性抗體A1594 (Sigma Aldrich)；

(i)用以測定BSAP水準之BSAP特異性抗體SC-98652 (Santa Cruz)；

(j)用以測定CTX水準之CTX特異性抗體ABIN1173415 (Antibodies Online)；

(k)用以測定奧斯特里克斯水準之奧斯特里克斯特異性抗體SC-22538 (Santa Cruz)；

(l)用以測定克羅索水準之克羅索特異性抗體SC-22218 (Santa Cruz)；

(m)用以測定α-SMA水準之α-SMA特異性抗體SC-53142 (Santa Cruz)；

(n)用以測定MYOCD水準之MYOCD特異性抗體SC-21561 (Santa Cruz)；及/或

(o)用以測定Sm22-α水準之Sm22-α特異性抗體SC-271719 (Santa Cruz)；

(p)用以測定ActRIIA水準之ActRIIA特異性抗體ab135634 (Abcam)。

57. 如請求項1至17中任一項之方法，其中該Snail、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α水準分別為Snail、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA及/或Sm22-α之mRNA水準。

58. 如請求項18至52中任一項之方法，其中該Snail、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α水準分別為Snail、Dkk1、col1a1、活化素、Runx2、Alp、BSAP、CTX、奧斯特里克斯、克羅索、α-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2及/或Sm22-α之mRNA水準。

59. 如請求項57或58之方法，其中該mRNA水準藉由定量反轉錄聚合酶鏈反應(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction；qRT-PCR)測定。

60. 如請求項59之方法，其中該qRT-PCR用以下進行

(a)用以測定Runx2水準之Runx2特異性引子(SEQ ID NO:48及49)；

(b)用以測定Alp水準之Alp特異性引子(SEQ ID NO:50及51)；

(c)用以測定col1a1水準之Col1a1特異性引子(SEQ ID NO:82及83)；

(d)用以測定Snail水準之Snail特異性引子(SEQ ID NO:78及

79)；

(e)用以測定Dkk1水準之Dkk1特異性引子(SEQ ID NO:80及81)；

(f)用以測定活化素水準之活化素特異性引子(SEQ ID NO:84及85)；

(g)用以測定奧斯特里克斯水準之奧斯特里克斯特異性引子(SEQ ID NO:52及53)；

(h)用以測定克羅索水準之克羅索特異性引子(SEQ ID NO:54及55)；及/或

(i)用以測定Sm22-α水準之Sm22-α特異性引子(SEQ ID NO:56及57)。

61. 如請求項1至60中任一項之方法，其中該等水準存在於組織中。

62. 如請求項61之方法，其中該組織為主動脈、血清、骨髓、肝臟或脾。

63. 如請求項2、3、18或25中任一項之方法，其中該血管鈣化為鈣化動脈粥樣硬化、鈣化中層血管病變(亦稱為蒙克貝格中層鈣化硬化(Mönckeberg's medial calcific sclerosis))、中層鈣化、彈性組織鈣質沉著(elastocalcinosis)、鈣化尿毒症動脈病、鈣化主動脈瓣狹窄或門靜脈鈣化。

64. 如請求項1、19或26中任一項之方法，其中該心血管疾病為與諸如動脈粥樣硬化之血管鈣化、高脂質血症、骨質疏鬆、高血壓、發炎、2型糖尿病、末期腎病、所需切除術、彈性假黃瘤、先天性二尖瓣、風濕性心臟病、門靜脈高血壓或肝病相關之疾病。

65. 如請求項1、19或26之方法，其中該心血管疾病繼發於慢性腎病。

66. 如請求項65之方法，其中該慢性腎病為3期、4期或5期慢性腎病。

67. 如請求項65之方法，其中該慢性腎病為慢性腎病礦物質及骨骼疾病。

68. 如請求項1至67中任一項之方法，其中該ActRII信號傳導抑制劑為包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之多肽：

(a)與SEQ ID NO:2 90%一致；

(b)與SEQ ID NO:2 95%一致；

(c)與SEQ ID NO:2 98%一致；

(d) SEQ ID NO:2；

(e)與SEQ ID NO:3 90%一致；

(f)與SEQ ID NO:3 95%一致；

(g)與SEQ ID NO:3 98%一致；

(h) SEQ ID NO:3；

(i)與SEQ ID NO:6 90%一致；

(j)與SEQ ID NO:6 95%一致；

(k)與SEQ ID NO:6 98%一致；

(l) SEQ ID NO:6；

(m)與SEQ ID NO:7 90%一致；

(n)與SEQ ID NO:7 95%一致；

(o)與SEQ ID NO:7 98%一致；

(p) SEQ ID NO:7；

(q)與SEQ ID NO:12 90%一致；

(r)與SEQ ID NO:12 95%一致；

(s)與SEQ ID NO:12 98%一致；

(t) SEQ ID NO:12；

(u)與SEQ ID NO:17 90%一致；

(v)與SEQ ID NO:17 95%一致；

(w)與SEQ ID NO:17 98%一致；

(x) SEQ ID NO:17；

(y)與SEQ ID NO:20 90%一致；

(z)與SEQ ID NO:20 95%一致；

(aa)與SEQ ID NO:20 98%一致；

(bb) SEQ ID NO:20；

(cc)與SEQ ID NO:21 90%一致；

(dd)與SEQ ID NO:21 95%一致；

(ee)與SEQ ID NO:21 98%一致；及

(ff) SEQ ID NO:21。

69. 如請求項1至68中任一項之方法，其中該ActRII信號傳導抑制劑為包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之多肽。

70. 如請求項1至69中任一項之方法，其中該ActRII信號傳導抑制劑為由ActRIIA之細胞外結構域及人類IgG1 Fc結構域組成之人類化融合蛋白。

71. 如請求項1至70中任一項之方法，其中該個體為人類。

72. 如請求項1至71中任一項之方法，其中該參考群體由1、5、10、25、50、75、100、200、250、300、400、500或1000名個體組成。

73. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由健康人類組成。

74. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由年齡、體重及/或性別與該個體相同之人類組成。

75. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由無心血管疾

病之人類組成。

76. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由無血管鈣化之人類組成。

77. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由無腎病之人類組成。

78. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由無慢性腎病之人類組成。

79. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由無病理性升高之動脈硬度水準之人類組成。

80. 如請求項1至72中任一項之方法，其中該參考群體由無左心室肥大之人類組成。