



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105797135 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201610144786.3

A61P 7/00(2006.01)

(22)申请日 2007.12.18

C07K 14/71(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

(30)优先权数据

60/875682 2006.12.18 US

(62)分案原申请数据

200780051416.4 2007.12.18

(71)申请人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72)发明人 M.L.谢尔曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 李炳爱

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 7/06(2006.01)

权利要求书4页 说明书30页

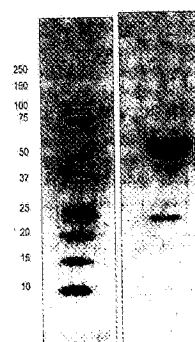
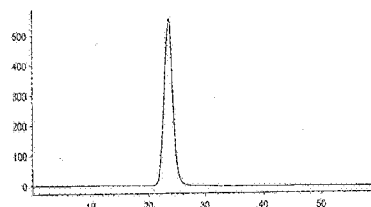
序列表23页 附图12页

(54)发明名称

活化素-ACTRII拮抗剂及在提高红细胞水平
中的用途

(57)摘要

在某些方面,本发明提供了用于提高脊椎动物
中红细胞和/或血红蛋白水平的组合物和方法,
所述脊椎动物包括啮齿动物和灵长动物,特
别是人。



1. 多肽在制备用于在有此需要的患者中治疗骨髓增生异常综合征、治疗血红蛋白病、治疗地中海贫血、治疗镰形细胞疾病、提高红细胞水平或提高血红蛋白水平的药物中的用途,其中所述多肽选自:

- a) 包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- b) 包含与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- c) 包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- d) 包含与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- e) 包含与SEQ ID NO:16具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- f) 包含与SEQ ID NO:17具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- g) 包含与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;和
- h) 包含与SEQ ID NO:21具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽。

2. 用于在有此需要的患者中治疗骨髓增生异常综合征、治疗血红蛋白病、治疗地中海贫血、治疗镰形细胞疾病、提高红细胞水平或提高血红蛋白水平的多肽,其中所述多肽选自::

- a) 包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- b) 包含与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- c) 包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- d) 包含与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- e) 包含与SEQ ID NO:16具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- f) 包含与SEQ ID NO:17具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
- g) 包含与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;和
- h) 包含与SEQ ID NO:21具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽。

3. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽结合活化素和/或GDF11。

4. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的氨基酸序列。

6. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

7. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的氨基酸序列。

8. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的氨基酸序列。

9. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

10. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:17具有至少90%同一性的氨基酸序列。

11. 如权利要求1所述的用途,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的氨基酸序列。

12. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

13. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:16具有至少90%同一性的氨基酸序列。

14. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:16具有至少95%同一性的氨基酸序列。

15. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

16. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列。

17. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的氨基酸序列。

18. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

19. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的氨基酸序列。

20. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的氨基酸序列。

21. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

22. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的氨基酸序列。

23. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:20具有至少95%同一性的氨基酸序列。

24. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

25. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:21具有至少90%同一性的氨基酸序列。

26. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:21具有至少95%同一性的氨基酸序列。

27. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

28. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽结合活化素。

29. 如权利要求28所述的用途,其中所述多肽结合活化素A。

30. 如权利要求28所述的用途,其中所述多肽结合活化素B。

31. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽结合GDF11。

32. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽结合活化素和GDF11。

33. 如权利要求1或2所述的用途或多肽,其中所述多肽具有一种或多种如下特征:

i) 以至少 10^{-7} M的 K_D 结合ActRII配体;和

ii) 在细胞中抑制ActRII信号传导。

34. 如权利要求1或2所述的用途或多肽, 其中所述多肽是包含免疫球蛋白Fc结构域的融合蛋白。

35. 如权利要求34所述的用途, 其中所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG1 Fc结构域。

36. 如权利要求1或2所述的用途或多肽, 其中所述多肽包含选自如下的一种或多种修饰的氨基酸残基: 糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸以及与脂质部分缀合的氨基酸。

37. 如权利要求34所述的用途, 其中所述药物用于施用, 从而在患者体内达到融合蛋白的至少100 ng/ml的血清浓度持续约20至30天的时间。

38. 如权利要求34所述的用途, 其中所述药物用于施用, 从而在患者体内达到融合蛋白的100 ng/ml至1000 ng/ml范围内的血清浓度。

39. 如权利要求34所述的用途, 其中所述融合蛋白具有介于15和30天之间的血清半衰期。

40. 如权利要求34所述的用途, 其中所述药物用于以不超过每周一次的频率施用至所述患者。

41. 如权利要求34所述的用途, 其中所述药物用于以不超过每月一次的频率施用至所述患者。

42. 用于制备用于治疗骨髓增生异常综合征的药物的如权利要求1-41中任一项所述的用途或多肽。

43. 用于制备用于治疗血红蛋白病的药物的如权利要求1-41中任一项所述的用途或多肽。

44. 权利要求43的用途或多肽, 其中所述血红蛋白病是镰形细胞疾病。

45. 权利要求43的用途或多肽, 其中所述血红蛋白病是地中海贫血。

46. 用于制备提高红细胞水平的药物的权利要求1-42中任一项的用途或多肽。

47. 用于制备提高血红蛋白水平的药物的权利要求1-42中任一项的用途或多肽。

48. 活化素-ActRII拮抗剂在制备用于在有此需要的患者中治疗骨髓增生异常综合征、治疗血红蛋白病、治疗地中海贫血、治疗镰形细胞疾病、提高红细胞水平或提高血红蛋白水平的药物中的用途, 其中所述活化素-ActRII拮抗剂选自:

a) 结合活化素的抗体;

b) 结合ActRII的抗体; 和

c) 卵泡抑素; 和

d) 抑制素。

49. 用于在有此需要的患者中治疗骨髓增生异常综合征、治疗血红蛋白病、治疗地中海贫血、治疗镰形细胞疾病、提高红细胞水平或提高血红蛋白水平的拮抗剂, 其中所述拮抗剂选自:

a) 结合活化素的抗体;

b) 结合ActRII的抗体; 和

c) 卵泡抑素; 和

d) 抑制素。

50. 权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是破坏活化素-ActRIIa结合的抗体。

51. 权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是结合活化素A的抗体。

52. 权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是结合活化素B的抗体。

53. 权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是卵泡抑素。

54. 权利要求53的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是卵泡抑素-288。

55. 权利要求53的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是卵泡抑素-315。

56. 权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述活化素-ActRII拮抗剂是抑制素。

57. 权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述多肽具有一种或多种如下特征:

i) 以至少 10^{-7} M的 K_D 结合ActRII配体;和

ii) 在细胞中抑制ActRII信号传导。

58. 如权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述药物用于施用,从而在患者体内达到活化素-ActRII拮抗剂的至少100 ng/ml的血清浓度持续约20至30天的时间。

59. 如权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述药物用于施用,从而在患者体内达到活化素-ActRII拮抗剂的100 ng/ml至1000 ng/ml范围内的血清浓度。

60. 如权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述融合蛋白具有介于15和30天之间的血清半衰期。

61. 如权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述药物用于以不超过每周一次的频率施用于所述患者。

62. 如权利要求49的用途或拮抗剂,其中所述药物用于以不超过每月一次的频率施用于所述患者。

63. 用于制备用于治疗骨髓增生异常综合征的药物的如权利要求49-61中任一项所述的用途或拮抗剂。

64. 用于制备用于治疗血红蛋白病的药物的如权利要求49-61中任一项所述的用途或拮抗剂。

65. 权利要求64的用途或拮抗剂,其中所述血红蛋白病是镰形细胞疾病。

66. 权利要求64的用途或拮抗剂,其中所述血红蛋白病是地中海贫血。

67. 用于制备提高红细胞水平的药物的权利要求49-61中任一项的用途或拮抗剂。

68. 用于制备提高血红蛋白水平的药物的权利要求49-61中任一项的用途或拮抗剂。

活化素-ACTRII拮抗剂及在提高红细胞水平中的用途

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2007年12月18日,申请号为200780051416.4(PCT/US2007/025868),发明名称为“活化素-ACTRII拮抗剂及在提高红细胞水平中的用途”。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2006年12月18日提交的美国临时专利申请60/875,682的权益,该申请全文在此引入作为参考。

背景技术

[0004] 成熟的红细胞(或红血球)负责脊椎动物循环系统中的氧的运输。红细胞携带高浓度的血红蛋白,血红蛋白是一种蛋白,其在相对高的氧分压(pO_2)下在肺中与氧结合,并将氧传递至具有相对较低 pO_2 的身体部分。

[0005] 成熟的红细胞可在称为红细胞生成的过程中由多能性造血干细胞生成。在出生后的个体中,红细胞生成主要在骨髓和脾的红髓中进行。各种信号转导途径的协同作用控制细胞增殖、分化、存活和死亡的平衡。在正常条件下,红细胞以可维持体内恒定的红细胞量的速率生成,且在响应各种刺激(包括上升或下降的氧张力或组织需求)中可提高或减少其生成。红细胞生成的过程开始于谱系定向前体细胞,并通过一系列的不同前体细胞类型进行。网织红细胞红细胞生成的最终阶段出现为网织红细胞释放进入血流,并失去它们的线粒体和核糖体,同时呈现成熟红细胞的形态。在血液中网织红细胞水平的上升或者网织红细胞:红细胞比例的上升标志着红细胞生成速率的上升。

[0006] 促红细胞生成素(Epo)被广泛认为是出生后脊椎动物中最重要的红细胞生成阳性调节剂。Epo可响应减少的组织氧张力(低氧)和低红细胞水平或低血红蛋白水平来调节补偿性红细胞生成。在人体内,上升的Epo水平可通过刺激骨髓和脾中红系祖细胞的生成而促进红细胞的形成。在小鼠中,Epo主要增加脾中的红细胞生成。

[0007] 医师们采用了各种形式的重组Epo来增加各种临床环境中的红细胞水平,特别针对贫血的治疗。贫血是一种具有较宽定义的病症,其特征存在于血液中的血红蛋白或红细胞低于正常水平。在部分案例中,贫血是由红细胞的生成或存活的原发性疾病所引起的。更常见情况下,贫血继发于其它系统的疾病(Weatherall&Provan(2000)Lancet 355,1169-1175)。贫血可由红细胞生成速率下降或破坏速率上升所导致,或者由因出血引起的红细胞丢失所导致。贫血可由多种疾病引起,所述疾病包括,例如,慢性肾功能衰竭、骨髓增生异常综合征、类风湿关节炎以及骨髓移植。

[0008] 以Epo进行治疗通常可导致健康人在一周以上的期间内约1-3g/dL的血红蛋白上升。当施用至贫血个体时,该治疗方案通常可提供血红蛋白和红细胞水平的大量上升,并使得生活质量改善和存活时间延长。Epo并非一律有效,许多个体甚至在高剂量下仍然不显疗效(Horl等人(2000)Nephrol Dial Transplant 15,43-50)。超过50%以上的癌症患者对Epo的响应不足,大约10%的末期肾病患者具有低响应性(Glaspy等人(1997)J Clin Oncol 15,1218-1234;Demetri等人(1998)J Clin Oncol 16,3412-3425),以及不到10%的骨髓增

生异常综合征患者能够顺利响应(Estey(2003)Curr Opin Hematol 10,60-67)。许多因素,包括炎症、铁和维生素缺乏、透析不充分、铝毒性以及甲状旁腺功能亢进可导致较差的治疗应答,对Epo耐受的分子机制仍然不清楚。

[0009] 因此,本公开的一个目标是提供增加患者红细胞水平的替代性组合物和方法。

[0010] 发明综述

[0011] 部分而言,本公开显示活化素拮抗剂以及ActRIIa和ActRIIb拮抗剂可用于增加红细胞和血红蛋白水平。具体来说,本公开显示ActRIIa的可溶形式作为活化素的抑制剂,且当其在体内施用是提高血液中的红细胞水平。对ActRIIb的可溶形式观察到较为温和的作用,其以比可溶ActRIIa更低的亲和性结合活化素A。尽管可溶ActRIIa和ActRIIb可能通过活化素拮抗以外的机制影响红细胞水平,本公开仍然显示了可在活化素拮抗或ActRII拮抗或者两者的基础上选择所需要的治疗剂。该种药剂被统称为活化素-ActRII拮抗剂。因此,在某些实施方式中,本公开提供了使用活化素-ActRII拮抗剂在有此需要的患者中增加患者红细胞和血红蛋白水平并治疗与低红细胞或血红蛋白水平相关的疾病的方法,该活化素-ActRII拮抗剂包括,例如,活化素-结合ActRIIa多肽,活化素-结合ActRIIb多肽,抗活化素抗体,抗ActRIIa抗体,抗ActRIIb抗体,靶向活化素、ActRIIb或ActRIIa的小分子和适体以及减少活化素、ActRIIb或ActRIIa的表达的核酸。如美国专利申请11/603,485(在此引入作为参考)所述,活化素-ActRIIa拮抗剂可用于促进骨生长和提高骨密度。如本文所述,该种拮抗剂对红细胞水平的作用相对该种拮抗剂对骨的作用更为快速并在更低剂量下产生。因此,在某些实施方式中,本公开提供使用活化素-ActRIIa拮抗剂提高红细胞或血红蛋白水平,而不引起骨密度明显升高的方法。例如,一种方法可引起小于3%、5%、10%或15%的骨密度增加。这种选择性作用可通过使用例如较低剂量活化素-ActRIIa拮抗剂、较低给药频率而达到,或通过使用在经计算可提供较低的血清浓度的剂量和频率的具有较短血清半衰期的活化素-ActRIIa拮抗剂而达到。

[0012] 在某些方面,本公开提供包含可溶、活化素-结合ActRII多肽的多肽,其结合活化素。所述活化素结合多肽可以是ActRIIa多肽或ActRIIb多肽。ActRII多肽可配制成药物制剂,其包含该活化素-结合ActRII多肽和药学上可接受的载体。该活化素-结合ActRII多肽可以小于1微摩尔或小于100、10或1纳摩尔的 K_D 与活化素结合。可选地,该活化素-结合ActRII多肽相对于结合GDF11和/或GDF8选择性地结合活化素,并可选地以比结合GDF11和/或GDF8至少低10倍、20倍或50倍的 K_D 结合活化素。尽管不希望受限于特定的作用机制,预期活化素抑制相对于GDF11/GDF8抑制的选择性程度解释了对骨或红细胞生成的作用,且对肌肉没有一致可测的作用。在许多实施方式中,会选择ActRII多肽,从而在达到对红细胞水平的所需作用的剂量下,引起肌肉中小于15%、小于10%或小于5%的增长。该组合物通过尺寸排阻层析估计相对于其它多肽成分可具有至少95%的纯度,可选地,该组合物具有至少98%的纯度。用于该种制备的活化素-结合ActRIIa多肽可以是本文所述的任意该种多肽,例如具有选自SEQ ID NO:2、3、7或12的氨基酸序列,或具有与选自SEQ ID NO:2、3、7、12或13的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%的同一性的氨基酸序列的多肽。活化素-结合ActRIIa多肽可包含天然ActRIIa多肽的功能性片段,例如具有选自序列SEQ ID NO:1-3或序列SEQ ID NO:2的至少10、20或30个氨基酸,缺失C-末端10至15个氨基酸(“尾部”)的功能性片段。用于该种制备的活化素-结合ActRIIb多肽可以是本文所述的任

意该种多肽,例如具有选自SEQ ID NO:16、17、20或21的氨基酸序列,或具有与选自SEQ ID NO:16、17、20或21的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%的同一性的氨基酸序列的多肽。活化素-结合ActRIIb多肽可包含天然ActRIIb多肽的功能性片段,例如具有选自SEQ ID NO:15-17的至少10、20或30个氨基酸或缺失C-末端10至15个氨基酸(“尾部”)的序列例如SEQ ID NO:17的功能性片段。

[0013] 可溶、活化素-结合ActRII多肽可包括相对天然存在的ActRII多肽在氨基酸序列(例如,在配体-结合结构域)中的一个或多个替换。例如,在W02006/012627中的第59-60页和第55-58页(在此引入作为参考)分别提供了变化的ActRIIa和ActRIIb多肽的实例。在氨基酸序列中的变化可以例如,在其在哺乳动物、昆虫或其它真核细胞中生成时改变多肽的糖基化,或者相对于天然存在的ActRII多肽改变多肽的蛋白水解裂解。

[0014] 活化素-结合ActRII多肽可以是一种融合蛋白,其有作为一种结构域的ActRII多肽(例如,ActRIIa或ActRIIb的配体-结合部分)和提供所需性能(例如改善的药物代谢动力学、更简单的纯化、靶向特定的组织等)的一种或多种其它结构域。例如,融合蛋白的结构域可增强体内稳定性、体内半衰期、摄取/施用、组织定位或分布、蛋白复合物的形成、该融合蛋白的多聚化和/或纯化中的一种或多种。活化素-结合ActRII融合蛋白可包含能提供所需性能(例如改善的药物代谢动力学、提高的溶解度或提高的稳定性)的免疫球蛋白Fc结构域(野生型或突变)或血清白蛋白或其它多肽部分。在优选的实施方式中,ActRII-Fc融合包含在Fc结构域和胞外ActRII结构域之间的相对非结构化的接头。该非结构化的接头可对应于ActRII的胞外结构域的C-末端的约15个氨基酸的非结构化区(“尾部”),或者它可以是相对不含二级结构的1、2、3、4或5个氨基酸的人工序列或长度在5和15、20、30、50或更多氨基酸的人工序列,或者两者的混合物。接头可富含甘氨酸或脯氨酸残基,并可以例如,包含苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单独序列或苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列(例如,TG₄(SEQ ID NO:22)或SG₄(SEQ ID NO:23)单态或重复)。融合蛋白可包含纯化子序列,例如表位标记、FLAG标记、聚组氨酸序列和GST融合。可选地,可溶ActRII多肽包含选自如下的一种或多种修饰的氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸以及与有机衍生剂缀合的氨基酸。药物制剂还可包含一种或多种附加化合物,例如可用于治疗骨病的化合物。优选地,药物组合物基本不含热原。一般而言,优选在哺乳动物细胞系中表达ActRII蛋白,其合适地介导ActRII蛋白的天然糖基化,从而减少患者中的不利免疫应答的可能性。人和CHO细胞系已被成功使用,也可预期使用其它常见的哺乳动物表达系统。

[0015] 本文所述的ActRIIa蛋白特指具有所需特性的ActRIIa-Fc(在ActRIIa部分和Fc部分之间具有最小接头的形式),其包括在动物模型中相对GDF8/GDF11选择性结合活化素、高亲和性配体结合和大于两周的血清半衰期。在某些实施方式中,本发明提供了ActRII-Fc多肽和包含该多肽和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。

[0016] 在某些方面,本公开提供了编码可溶活化素-结合ActRII多肽(例如ActRIIa或ActRIIb多肽)的核酸。分离的多聚核苷酸可包含例如上述的可溶的、活化素-结合ActRII多肽的编码序列。例如,分离的核酸可包含编码ActRII的胞外结构域(例如,配体-结合结构域)的序列以及编码ActRII的部分或全部跨膜结构域和/或细胞质结构域,除定位在该跨膜结构域或细胞质结构域中、或定位在该胞外结构域和该跨膜结构域或细胞质结构域之间的

终止密码子外的序列。例如,分离的多聚核苷酸可包含全长ActRIIa多聚核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:4或5)或全长ActRIIb多聚核苷酸序列(例如SEQ ID NO:18),或部分截短的ActRIIa或ActRIIb形式,所述分离的多聚核苷酸进一步包含在3'-末端之前至少六百个核苷酸处或其它位置的转录末端密码子,从而使该多聚核苷酸的翻译形成可选地融合至全长ActRII的截短部分的胞外结构域。优选的ActRIIa的核酸序列为SEQ ID NO:14。此处披露的核酸可操作地连接至表达启动子,且该公开提供了用这种重组多聚核苷酸转化的细胞。所述细胞优选为哺乳动物细胞,例如CHO细胞。

[0017] 在某些方面,本公开提供了制备可溶的、活化素-结合ActRII多肽的方法。所述方法可包括在合适的细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达此处披露的任意核酸(例如,SEQ ID NO:4、5、14、18或19)。这种方法可包括:a)在适于所述可溶ActRII多肽表达的条件下培养细胞,其中所述细胞以可溶ActRII表达构建体转化;和b)回收如此表达的可溶ActRII多肽。可溶ActRII多肽可作为粗制品、部分纯化或高度纯化的组分回收。纯化可通过一系列纯化步骤实现,所述步骤包括例如,任意顺序的如下步骤中的一种、两种或三种或多种:蛋白A色谱、阴离子交换色谱(例如,Q琼脂糖)、疏水作用色谱(例如,苯基琼脂糖)、尺寸排阻层析以及阳离子交换色谱。

[0018] 在某些方面,本文披露的活化素-ActRII拮抗剂,例如,可溶的、活化素-结合ActRIIa多肽或可溶的、活化素-结合ActRIIb多肽,可用于在对象中促进红细胞生成或增加红细胞水平的方法中。在某些实施方式中,本公开提供了在有此需要的患者中治疗与低红细胞数或低血红蛋白水平相关的疾病(例如,贫血)的方法。方法可包括向有此需要的对象施用有效量的活化素-ActRII拮抗剂。在某些方面,所述公开提供了活化素-ActRII拮抗剂在制备用于治疗本文披露的疾病或病症的药物中的用途。

[0019] 在某些方面,所述公开提供了鉴定刺激红细胞生成的药剂的方法。所述方法包括:a)鉴定结合ActRII多肽的活化素或配体-结合结构域的测试药剂;以及b)评估所述药剂对红细胞、血红蛋白水平和/或红细胞前体水平(例如,网织红细胞水平)的作用。

附图说明

[0020] 图1显示了在CHO细胞中表达的ActRIIa-hFc的纯化。该蛋白纯化为通过排阻柱显示的单独的、轮廓清晰的峰(上图)和Coomassie染色的SDS-PAGE(下图)(左泳道:分子量标准;右泳道:ActRIIa-hFc)。

[0021] 图2显示了通过BiaCore™测定的ActRIIa-hFc与活化素和GDF-11的结合。

[0022] 图3显示了ActRIIa-hFc对雌性非人灵长动物的红细胞数的影响。在第0天、第7天、第14天和第21天以安慰剂或1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的ActRIIa-hFc治疗雌性短尾猴(四组,每组五只猴)。图3A显示红细胞(RBC)数。图3B显示血红蛋白水平。统计显著性是相对于每个治疗组的基线。在第57天,每个组保留两只猴子。

[0023] 图4显示了ActRIIa-hFc对雄性非人灵长动物的红细胞数的影响。在第0天、第7天、第14天和第21天以安慰剂或1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的ActRIIa-hFc治疗雄性短尾猴(四组,每组五只猴)。图4A显示红细胞(RBC)数。图4B显示血红蛋白水平。统计显著性是相对于每个治疗组的基线。在第57天,每个组保留两只猴子。

[0024] 图5显示了ActRIIa-hFc对雌性非人灵长动物的网织红细胞数的影响。在第0天、第

7天、第14天和第21天以安慰剂或1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的ActRIIa-hFc治疗短尾猴(四组,每组五只猴)。图5A显示绝对网织红细胞数。图5B显示网织红细胞相对于RBC的百分比。统计显著性是相对于每个组的基线。在第57天,每个组保留两只猴子。

[0025] 图6显示了ActRIIa-hFc对雄性非人灵长动物的网织红细胞数的影响。在第0天、第7天、第14天和第21天以安慰剂或1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的ActRIIa-hFc治疗短尾猴(四组,每组五只猴)。图6A显示绝对网织红细胞数。图6B显示网织红细胞相对于RBC的百分比。统计显著性是相对于每个组的基线。在第57天,每个组保留两只猴子。

[0026] 图7显示了实施例5中的人类临床试验所得的结果,其中曲线下面积(AUC)和ActRIIa-hFc的施用剂量具有线性关系,而与ActRIIa-hFc是通过静脉(IV)施用还是皮下(SC)施用无关。

[0027] 图8显示了IV或SC施用的患者中的ActRIIa-hFc血清水平的比较。

[0028] 图9显示了响应不同剂量水平的ActRIIa-hFc的骨碱性磷酸酶(BAP)水平。BAP是合成代谢骨生长的标记。

[0029] 图10显示了来自实施例5所述人临床试验的血细胞比容水平基线的中值变化。ActRIIa-hFc以所示的剂量静脉(IV)施用。

[0030] 图11显示了来自实施例5所述人临床试验的血红蛋白水平基线的中值变化。ActRIIa-hFc以所示的剂量静脉(IV)施用。

[0031] 图12显示了来自实施例5所述人临床试验的RBC(红细胞)数基线的中值变化。ActRIIa-hFc以所示的剂量静脉(IV)施用。

[0032] 图13显示了来自实施例5所述人临床试验的网织红细胞数基线的中值变化。ActRIIa-hFc以所示的剂量静脉(IV)施用。

[0033] 发明详述

[0034] 1. 综述

[0035] 转化生长因子- β (TGF- β)超家族包含各种具有共同的序列元件和结构基序的生长因子。这些蛋白已知可同时对脊椎动物和无脊椎动物中的各种各样的细胞类型产生生物效应。该超家族的成员在胚胎发育过程中在图式形成和组织特异性中具有重要的功能,并能影响多种分化过程,包括脂肪形成、肌细胞形成、软骨形成、心脏发生、血细胞形成、神经发生以及上皮细胞分化。该家族被分为两大分支:BMP/GDF和TGF- β /活化素/BMP10分支,其成员具有不同的,通常是互补的作用。通过调节TGF- β 家族成员的活性,通常可能引起有机体的明显生理变化。例如,皮尔蒙特与比利时蓝牛繁殖携带GDF8(也称为肌肉抑制素)基因的功能丧失突变,其导致肌肉量的明显增加。Grobet等人,Nat Genet.1997,17(1):71-4。此外,在人类体内,灭活GDF8等位基因与肌肉量的上升相关,且据报道与异常的力量相关。Schuelke等人,N Engl J Med 2004,350:2682-8。

[0036] 活化素是二聚多肽生长因子,其属于TGF- β 超家族。存在三种主要的活化素形式(A,B和AB),其为两种密切相关的 β 亚基的同源/异源二聚体(分别为 $\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)。

[0037] 人基因组还编码活化素C和活化素E,其主要在肝中表达,同样已知包括 β_c 或 β_e 的异源二聚体形式。在TGF- β 超家族中,活化素是独特的和多功能的因子,它能刺激卵巢和胎盘细胞中的激素生成,支持神经元细胞存活,根据细胞类型积极或消极影响细胞周期进展,并至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层的分化(DePaolo等人,1991,Proc Soc Exp Biol

Med. 198:500-512; Dyson等人, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963)。此外, 业已发现从刺激后的人单核白血病细胞中分离的红细胞分化因子(EDF)与活化素A相同(Murata等人, 1988, PNAS, 85:2434)。业已表明活化素A促进骨髓中的红细胞生成。在多种组织中, 活化素信号传导被它的相关异源二聚体抑制素所拮抗。例如, 在从脑垂体释放促卵泡激素(FSH)的过程中, 活化素促进FSH分泌和合成, 而抑制素阻止FSH的分泌和合成。其它可调节活化素生物活性和/或结合活化素的蛋白包括卵泡抑素(FS)、卵泡抑素相关蛋白(FSRP)和 α 2-巨球蛋白。

[0038] TGF- β 信号受到I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的杂聚肽复合物所介导, 其在受到配体刺激时磷酸化和激活下游Smad蛋白(Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178)。这些I型和II型受体为跨膜蛋白, 由富含半胱氨酸区的配体-结合胞外结构域、跨膜结构域、具有预定的丝氨酸/苏氨酸特异性的细胞质结构域所组成。I型受体为信号传导所必需; 在结合配体和I型受体的表达中需要II型受体。I和II型活化素受体在配体结合后形成稳定的复合物, 导致I型受体被II型受体磷酸化。

[0039] 两种相关的II型受体(ActRII), ActRIIa和ActRIIb已被鉴定为活化素的II型受体(Mathews和Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano等人, 1992, Cell 68:97-108)。除了活化素外, ActRIIa和ActRIIb能够与多种其它的TGF- β 家族蛋白(包括BMP7、Nodal、GDF8和GDF11)进行生化形式的相互作用(Yamashita等人, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee和McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo和Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957; Oh等人, 2002, Genes Dev. 16:2749-54)。ALK4是活化素(特别是活化素A)的主要的I型受体, 而ALK-7也可用作活化素(特别是活化素B)的受体。

[0040] 如本文所证实, 相对其它TGF- β 家族成员(例如GDF8或GDF11)明显优先结合活化素A的可溶ActRIIa多肽(sActRIIa)能够有效提高体内红细胞水平。然而不希望受限于任何具体机制, 假定在这些研究中所用的具体sActRIIa构建体所显示的极强活化素结合(皮摩尔解离常数), 预期sActRIIa的作用主要由活化素拮抗剂作用所引起。不考虑机制, 从本公开可显而易见地看到: ActRIIa-活化素拮抗剂提高了啮齿动物、猴和人的红细胞水平。应指出: 血细胞生成是一种复杂的过程, 它受到多种因素的调节, 包括促红细胞生成素、G-CSF和铁的体内平衡。术语“提高红细胞水平”和“促进红细胞形成”指临床观察的测量指标, 例如血细胞比容、红细胞计数和血红蛋白测量, 其意在对该种变化发生的机制保持中立。

[0041] 同样如本文所示, 可溶ActRIIb多肽(sActRIIb)有效提高体内网织红细胞的水平, 该作用预期在更长的时间期间内可引起血细胞比容水平升高。

[0042] 本文报道的针对非人类灵长动物的数据可在小鼠、大鼠和人中重复, 因此, 本公开提供了采用ActRII多肽和其它活化素-ActRII拮抗剂在从啮齿动物到人类的哺乳动物中促进红细胞生成和提高红细胞水平的方法。活化素-ActRII拮抗剂包括例如, 活化素-结合的可溶ActRIIa多肽, 活化素-结合的可溶ActRIIb多肽, 结合活化素(特别是活化素A和B亚基, 也称为 β A和 β B)以及破坏ActRIIa和/或ActRIIb结合的抗体, 结合ActRIIa并破坏活化素结合的抗体, 结合ActRIIb并破坏活化素结合的抗体, 选择用于活化素、ActRIIb或ActRIIa结合的非抗体蛋白(该种蛋白及其设计和选择的方法可参见, 例如WO/2002/088171、WO/2006/055689和WO/2002/032925), 选择用于活化素、ActRIIb或ActRIIa结合的随机化的肽, 通常附着在Fc结构域上。具有活化素、ActRIIb或ActRIIa结合活性的两种不同蛋白(或其它部

分),特别是分别阻断I型(例如,可溶I型活化素受体)和II型(例如,可溶II型活化素受体)结合位点的活化素结合剂,可连接在一起创建双功能结合分子。抑制该活化素-ActRII信号传导轴的核酸适体、小分子和其它药剂也包括在活化素-ActRII拮抗剂之中。各种蛋白具有活化素-ActRII拮抗剂活性,包括抑制素(即,抑制素 α 亚基)(尽管抑制素并不在所有的组织中普遍拮抗活化素)、卵泡抑素(例如,卵泡抑素-288和卵泡抑素-315)、FSRP、活化素C、 α (2)-巨球蛋白、以及M108A(在位置108由蛋氨酸突变为丙氨酸)突变活化素A。一般而言,活化素的替代形式,特别是在I型受体结合结构域中替代的形式,能够结合II型受体且不能形成活性三元复合物,因此作为拮抗剂。此外,能够抑制活化素A、B、C或E或者特别地能够抑制ActRIIa或ActRIIb表达的核酸,如反义分子,siRNA或核酶能被用作活化素-ActRII拮抗剂。待使用的该活化素-ActRII拮抗剂可显示对活化素-介导的信号传导相对于其它TGF- β 家族成员,特别是相对于GDF8和GDF11的抑制选择性。

[0043] 在本发明的上下文中以及在每个术语所用的特定的上下文中,在本说明书中所用的这些术语通常具有本领域的一般含义。在下文以及说明书的其它部分讨论了某些术语,从而在描述本发明的组合物和方法以及如何制造和使用它们的方面为从业者提供额外的指导。术语的任何使用范围和含义将从该术语所用的特定上下文变得显而易见。

[0044] “大约”和“约”一般指在给定测量法的性质和精确性的前提下测得数值的可接受误差程度。典型地,示范性误差程度为在给定的数值或数值范围的20%以内,优选在10%以内,更优选在5%以内。

[0045] 替代性地,特别是在生物系统中,术语“大约”和“约”可表示在一定数量级范围内,优选在给定值的5倍以内,更优选在2倍以内的平均值。除非另有说明,此处给出的数量为近似值,表示在未明确指出时,可推出术语“大约”或“约”。

[0046] 本发明的方法可包括对序列彼此比较的步骤,包括将野生型序列与一种或多种突变体(序列变体)进行比较。该种比较通常包括聚合物序列的比对,例如,采用本领域公知的序列比对程序和/或算法(例如,稍加举例,BLAST、FASTA和MEGALIGN)进行。技术人员可容易地理解:在该种比对中,当突变包含残基插入或删除时,该序列比对将在未包含该插入或删除残基的聚合物序列中引入“间隙”(通常由破折号或“A”表示)。

[0047] “同源性”及其所有的语法形式和拼写变体均指具有“共同进化起源”的两种蛋白(包括来自相同生物物种的超家族的蛋白,以及来自不同生物物种的同源性蛋白)之间的关系。这种蛋白(及其编码核酸)具有序列同源性,这反映在它们的序列相似性,不管是根据百分比同一性还是通过特定残基或基序以及保守位置的存在。

[0048] 术语“序列相似性”及其所有的语法形式指具有或不具有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应性。

[0049] 然而,在通常的使用以及当前的应用中,当以副词例如“高度”修饰术语“同源性”时,可表示序列相似性,并涉及或不涉及共同进化起源。

[0050] 2. ActRII多肽

[0051] 在某些方面,本发明涉及ActRII多肽。本文所用的术语“ActRII”指II型活化素受体家族。该家族同时包括IIa型活化素受体和IIb型活化素受体。

[0052] 在某些方面,本发明涉及ActRIIa多肽。本文所用的术语“ActRIIa”指来自任意物种的IIa型活化素受体(ActRIIa)蛋白以及通过突变或其它修饰从该ActRIIa蛋白衍生的变

体的家族。在此提及ActRIIa时,应理解为提及目前鉴定的形式中的任意一种。该ActRIIa家族的成员通常为跨膜蛋白,由富含半胱氨酸区的配体-结合胞外结构域、跨膜结构域、具有预定的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域所组成。

[0053] 术语“ActRIIa多肽”包括包含天然存在的ActRIIa家族成员多肽及其保留了有用活性的任意变体(包括突变体、片段、融合体以及拟肽形式)的多肽。例如,参见W0/2006/012627。例如,ActRIIa多肽包括由任意已知ActRIIa的序列所衍生的多肽,其中该已知ActRIIa具有与ActRIIa多肽序列有至少80%同一性、任选至少85%、90%、95%、97%、99%或更高同一性的序列。例如,本发明的ActRIIa多肽可结合ActRIIa蛋白和/或活化素并抑制其功能。可根据在体内促进红细胞形成的活性选择ActRIIa多肽。ActRIIa多肽的实例包括人ActRIIa前体多肽(SEQ ID NO:1)和可溶的人ActRIIa多肽(例如,SEQ ID NO:2、3、7和12)。

[0054] 人ActRIIa前体多肽的序列如下:

[0055] MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~KDKRR~~HC~~FATWKN~~ISGSIEIVKQGCWLD~~D~~INCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG~~NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT~~PKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRF~~GCVWKAQL~~LLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVS~~W~~NELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFLALKEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMTNVD~~FPPKESSL~~(SEQ ID NO:1)

[0056] 信号肽以单下划线表示;胞外结构域以粗体表示,而潜在的N-连接的糖基化位点以双下划线表示。

[0057] 人可溶ActRIIa(胞外)加工的多肽序列如下:

[0058]

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~KDKRR~~HC~~FATWKN~~ISGSIEIVKQGCWLD~~D~~INCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG~~NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT~~PKPP(SEQ ID NO:2)

[0059] 胞外结构域的C-末端“尾部”以下划线表示。删除“尾部”的序列(Δ15序列)表示如下:

[0060]

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~KDKRR~~HC~~FATWKN~~ISGSIEIVKQGCWLD~~D~~INCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG~~NMCNEKFSYFPEM~~(SEQ ID NO:3)

[0061] 编码人ActRIIa前体蛋白的核酸序列如下:

[0062] (Genbank入口NM_001616的核苷酸164-1705):

[0063]

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTCTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTGTGTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTC

ATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGACCCAGGACC
ACCCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTG
TCTGGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAAT
GAATACGAAGTCTACAGTTTGCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCAC
CAGTGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCCTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATG
TGGTCTCTTGAATGAAGTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCT
GGCCTAAAAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCT
GACAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGG
TTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTTTTGAGGATA
GATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATA
CATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAA
AGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGG
GATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATAT
TATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTAGTCTAT
GA(SEQ ID NO:4)

[0064] 编码人ActRIIa可溶(胞外)多肽的核酸序列如下:

[0065]

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGG
TGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTGGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTG
AAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGC
CCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCAC
ACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC(SEQ ID NO:5)

[0066] 在某些方面,本发明涉及ActRIIb多肽。本文所用的术语“ActRIIb”指来自任意物种的IIb型活化素受体(ActRIIb)蛋白以及通过突变或其它修饰从该ActRIIb蛋白衍生的变体的家族。在此提及ActRIIb时,应理解为提及目前鉴定的形式中的任意一种。该ActRIIb家族的成员通常为跨膜蛋白,由富含半胱氨酸区的配体-结合胞外结构域、跨膜结构域、具有预定的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域所组成。

[0067] 术语“ActRIIb多肽”包括包含天然存在的ActRIIb家族成员多肽及其保留了有用活性的任意变体(包括突变体、片段、融合体以及拟肽形式)的多肽。例如,参见WO/2006/012627。例如,ActRIIb多肽包括由任意已知ActRIIb的序列所衍生的多肽,其中该已知ActRIIb具有与ActRIIb多肽序列有至少80%同一性、任选至少85%、90%、95%、97%、99%或更高同一性的序列。例如,本发明的ActRIIb多肽可结合ActRIIb蛋白和/或活化素并抑制其功能。可根据在体内促进红细胞形成的活性选择ActRIIb多肽。ActRIIb多肽的实例包括人ActRIIb前体多肽(SEQ ID NO:15)和可溶的人ActRIIb多肽(例如,SEQ ID NO:16、17、20和21)。人ActRIIb前体多肽的序列如下:

[0068] MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTQSGLERCEGEQDKRLHCYASWAN
SSGTIELVKKGCVLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYS
LLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFAVKIF
PLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLIITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMSR

GLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGGLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGA
INFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPL
AQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI(SEQ ID NO:15)

[0069] 信号肽以单下划线表示;胞外结构域以粗体表示,而潜在的N-连接的糖基化位点以方框表示。

[0070] 人可溶的ActRIIb(胞外)加工的多肽序列如下:

[0071]

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEE
NPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT(SEQ ID NO:16)

[0072] 胞外结构域的C-末端“尾部”以下划线表示。删除“尾部”的序列(Δ15序列)表示如下:

[0073]

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEE
NPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA(SEQ ID NO:17)

[0074] 编码人ActRIIb前体蛋白的核酸序列如下:(Genbank入口NM_001616的核苷酸5-1543)

[0075]

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCCCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGAC
ACGGGAGTGCTACTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCTGGAGCGCTGCGAAGGCG
AGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGC
TGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTG
CTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCAC
CCCCGACAGCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGGGGCCTTTCCCTCATCGTCCTG
CTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGA
AGGCCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAACGG
GAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCCTGCTACAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCT
CGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGATTACCTCAAGGGGAACATCATCA
CATGGAACGAACTGTGTCTGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGC
CGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCAC
AGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTGGCTGTTGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTCCAGAGAGATGCCTTCTGCGCATTGAC
ATGTATGCCATGGGGTTGGTGCTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACAT
GCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGACAAGAAGATGA
GGCCCACCATTAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGCTGGGAC
CATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCCGAGGTCCGTCAACGGCAC
TACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA
(SEQ ID NO:18)

[0076] 编码人ActRIIb可溶(胞外)的多肽的核酸序列如下:

[0077]

TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCA TCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAG AACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGG CCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCACC(SEQ ID NO:19)

[0078] 在具体的实施方式中,本发明涉及可溶的ActRII多肽。本文所述的术语“可溶的ActRII多肽”通常指包含ActRIIa或ActRIIb蛋白的胞外结构域的多肽。本文所用的术语“可溶的ActRII多肽”包括任何天然存在的ActRIIa或ActRIIb蛋白及其任何变体(包括突变体、片段以及拟肽形式)的胞外结构域。活化素-结合ActRII多肽是一种保留了与活化素(包括例如,活化素AA、AB、BB或包含C或E亚基的形式)结合的能力的多肽。活化素-结合ActRII多肽将任选以1nM或更小的解离常数与活化素AA结合。ActRII蛋白的胞外结构域可与活化素结合,并通常为可溶的,因此可被称为可溶的、活化素-结合ActRII多肽。可溶的、活化素-结合ActRII多肽的实例包括SEQ ID NO:2、3、7、12和13所示的可溶多肽。SEQ ID NO:7被称为ActRIIa-hFc,并在实施例中得到进一步描述。可溶的、活化素-结合ActRII多肽的其它实例包括ActRIIa蛋白胞外结构域以外的信号序列,例如,蜜蜂蜂毒肽前导序列(SEQ ID NO:8)、组织纤溶酶原激活剂(TPA)前导序列(SEQ ID NO:9)或天然ActRIIa前导序列(SEQ ID NO:10)。在SEQ ID NO:13中所示的ActRIIa-hFc多肽采用TPA前导序列。可溶的、活化素-结合ActRIIb多肽的实例包括SEQ ID NO:16、17、20所示的可溶的多肽。活化素-结合ActRIIb多肽还可包括ActRIIb蛋白胞外结构域以外的信号序列,例如,蜜蜂蜂毒肽前导序列(SEQ ID NO:8)或组织纤溶酶原激活剂(TPA)前导序列(SEQ ID NO:9)。

[0079] ActRII多肽的功能活性片段可通过筛选从编码ActRII多肽的核酸的相应片段重组生成的多肽获得。此外,可采用本领域已知技术如常规的Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学来化学合成片段。该片段可(通过重组或化学合成)生成并进行测试,以鉴定能够作为ActRII蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂(抑制剂)的肽基片段。

[0080] ActRII多肽的功能活性变体可通过从编码ActRII多肽的相应突变核酸重组生成的经修饰的多肽的库筛选获得。该变体可生成并进行测试,以鉴定能够作为ActRII蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂(抑制剂)的变体。在某些实施方式中,ActRIIa多肽的功能变体包含与选自SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。在某些情况下,该功能变体具有与选自SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,ActRIIb多肽的功能变体包含与选自SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。在某些情况下,该功能变体具有与选自SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0081] 功能变体可通过为增强治疗效力或稳定性(例如,先体外后体内保存期以及对体内蛋白水解降解的耐受性)等目的对ActRII多肽的结构进行修饰后生成。在选择保留活化素结合时,这种修饰的ActRII多肽被认为是天然存在的ActRII多肽的功能等价物。修饰的ActRII多肽还可通过例如,氨基酸置换、删除或添加得以生成。例如,可以合理预期以异亮氨酸或缬氨酸单独置换亮氨酸、以谷氨酰胺置换天冬酰胺、以丝氨酸置换苏氨酸或以结构

相关氨基酸进行的类似氨基酸置换(例如,保守突变)将不会对所得分子的生物活性产生较大的影响。保守替换是发生在侧链相关的氨基酸家族内的替换。在ActRII多肽的氨基酸序列中的变化是否得到功能性同系物可通过评估ActRII多肽变体在细胞中以类似于野生型ActRII多肽的方式生成应答的能力容易地测定。

[0082] 在某些实施方式中,本发明预期了ActRII多肽的特定突变以改变该多肽的糖基化。可通过选择这种突变来引入或去除一个或多个糖基化位点,例如O-连接的或N-连接的糖基化位点。天冬酰胺-连接的糖基化识别位点通常包含三肽序列,天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸(其中“X”为任意氨基酸),其被适当的细胞糖基化酶特异性识别。还可通过对野生型ActRII多肽序列进行一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或置换(针对O-连接的糖基化位点)以进行该种改变。在糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置之一或两者进行的各种氨基酸置换或删除(和/或在第二位置的氨基酸删除)可导致在修饰三肽序列的非糖基化。在ActRII多肽增加糖部分数量的另一种方式是通过向该ActRII多肽化学或酶催化偶联糖苷。根据所用的偶联模式,该糖可被连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧酸基团;(c)游离巯基基团,例如半胱氨酸的巯基基团;(d)游离羟基基团,例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基基团;(e)芳香残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香残基;或者(f)谷氨酰胺的酰胺基团。在ActRII多肽上去除一个或多个糖部分可通过化学和/或酶催化方法实现。化学去糖基化可涉及,例如,将该ActRII多肽暴露至化合物三氟甲烷磺酸或同等的化合物。该处理导致除了连接的糖(N-乙酰基葡萄糖胺或N-乙酰基半乳糖胺)以外大部分或全部糖的裂解,同时保持氨基酸序列完整。在ActRII多肽上糖部分的酶催化裂解可通过采用Thotakura等人(1987)*Meth. Enzymol.* 138:350所述的各种内切和外切糖苷酶得以实现。ActRII多肽的序列可根据所用表达系统的类型进行适当的调整,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可导入不同的糖基化类型,其可受到肽的氨基酸序列的影响。一般而言,用于人类的ActRII蛋白可在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系中表达,例如HEK293或CHO细胞系,尽管其它的哺乳动物表达细胞系也预期有用。

[0083] 本公开进一步预期生成突变体的方法,特别是生成ActRII多肽的组合突变体,以及截短突变体组;组合突变体集合对于鉴定功能变体序列特别有用。筛选该种组合库的目的可以是生成例如结合活化素或其它配体的ActRII多肽变体。下文提供了多种筛选测定,该种测定可用于评估变体。例如,可筛选具有结合ActRII配体的能力的ActRII多肽变体,以防止ActRII配体与ActRII多肽结合或者干扰ActRII配体引起的信号传导。

[0084] ActRII多肽或其变体的活性也可在基于细胞的测定或体内测定中进行测试。例如,可以评估ActRII多肽变体对涉及造血作用的基因表达的影响。根据需要,这可以在一种或多种重组ActRII配体蛋白(例如,活化素)的存在下进行,且可转染细胞以生成ActRII多肽和/或其变体,以及可选的ActRII配体。同样地,可将ActRII多肽施用至小鼠或其它动物,并可进行一种或多种血液测量,例如RBC计数、血红蛋白或网织红细胞计数。

[0085] 可生成相对于天然存在的ActRII多肽具有选择性或通常更高的效力的组合衍生变体。同样地,可突变产生变体,该变体的胞内半衰期明显不同于相应的野生型ActRII多肽。例如,该种改变的蛋白可对于蛋白水解降解或其它导致天然ActRII多肽的破坏或失活的细胞过程变得更加稳定或更加不稳定。该种变体以及编码它们的基因可用于通过调节该ActRII多肽的半衰期来改变ActRII多肽水平。例如,较短的半衰期可以产生更为短暂的生

物效应,并对于部分的可诱导表达系统可允许对该细胞中重组ActRII多肽水平的更强控制。在Fc融合蛋白中,可在接头(如有)和/或Fc部分进行突变以改变该蛋白的半衰期。

[0086] 组合库可通过编码多肽库的基因的简并库得到,其中多肽库中的每个多肽包含至少部分的潜在ActRII多肽序列。例如,可将合成的寡核苷酸的混合物酶催化连接至基因序列,从而使潜在ActRII多肽核苷酸序列的简并组能作为单独多肽进行表达,或者替代性地,作为更大的融合蛋白组进行表达(例如,针对噬菌体展示)。

[0087] 可通过多种方式从简并寡核苷酸序列生成潜在同系物的库。简并基因序列的化学合成可在自动化DNA合成仪中进行,且该合成的基因可被连接至适当的载体进行表达。简并寡核苷酸的合成已为本领域公知(例如参见Narang,SA(1983)*Tetrahedron* 39:3;Itakura等人,(1981)*Recombinant DNA,Proc.3rd Cleveland Sympos.Macromolecules*,ed.AG Walton,Amsterdam:Elsevier pp273-289;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)。该种技术已经被用于其它蛋白的直接进化中(例如参见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;以及美国专利5,223,409、5,198,346和5,096,815)。

[0088] 替代性地,可采用其它的突变形式来生成组合库。例如,可通过如下方式生成和从库中筛选分离ActRII多肽变体,例如,丙氨酸扫描突变等(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;以及Cunningham等人,(1989)*Science* 244:1081-1085)、接头扫描突变(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)、饱和突变(Meyers等人,(1986)*Science*232:613)、PCR突变(Leung等人,(1989)*Method Cell Mol Biol* 1:11-19);或者随机突变,包括化学突变等(Miller等人,(1992)*A Short Course in Bacterial Genetics*,CSHL Press,Cold Spring Harbor,NY;以及Greener等人,(1994)*Strategies in Mol Biol* 7:32-34)。接头扫描突变(特别是在组合设置(combinatorial setting)中)是一种具有吸引力的鉴定ActRII多肽的截短(生物活性)形式的方法。

[0089] 本领域已知从点突变和截短生成的组合库筛选基因产物的各种技术,由此已知针对具有某些属性的基因产物的cDNA库筛选技术。这些技术将普遍适用于通过ActRII多肽组合突变生成的基因库的快速筛选。筛选大型基因库广泛应用的技术通常包括将该基因库克隆进入可复制表达载体,以所得的载体库转化适当的细胞,并在所需活性的检测促进编码测得产物的基因的载体相对容易分离的条件下表达该组合基因。优选的测定包括活化素结合测定和活化素-介导的细胞信号传导测定。

[0090] 在某些实施方式中,本发明的ActRII多肽可进一步包括在ActRII多肽中天然存在任意修饰的之外的翻译后修饰。这些修饰包括,但不限于,乙酰化、羧酸化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。其结果是,该修饰的ActRII多肽可包含非氨基酸元件,例如聚乙二醇、脂质、多或单糖以及磷酸酯。该种非氨基酸元件对ActRII多肽功能的作用可通过本文所述的针对其

它ActRII多肽变体的方法进行测试。当ActRII多肽是通过在细胞中裂解ActRII多肽的新生形式生成时,翻译后加工也可能对该蛋白正确的折叠和/或功能非常重要。不同的细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)对该种翻译后活动具有特别的细胞结构和特征机制,并进行选择以确保该ActRII多肽的正确修饰和加工。

[0091] 在某些方面,该ActRII多肽的功能变体或修饰形式包括具有该ActRII多肽至少一部分和一种或多种融合结构域的融合蛋白。公知的该种融合结构域的实例包括,但不限于,聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可选择融合结构域来赋予所需的属性。例如,部分融合结构域对于该融合蛋白通过亲和层析分离特别有用。针对进行亲和纯化的目的,可使用亲和层析的相关基质,例如谷胱甘肽-、淀粉酶-、以及镍-或钴-结合的树脂。该类基质中许多可以“试剂盒”形式提供,例如可用于(HIS6)融合伙伴的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress™系统(Qiagen)。作为另一实例,可选择融合结构域以促进该ActRII多肽的检测。该种检测结构域的实例包括各种荧光蛋白(例如,GFP)以及“表位标记”,其通常为短肽序列,由其可获得特异性抗体。可容易地获得特异性单克隆抗体的公知表位标记包括FLAG、流感病毒血细胞凝集素(HA)和c-myc标记。在部分情况下,该融合结构域具有蛋白酶切割位点,例如Xa因子和凝血酶的切割位点,其允许相关的蛋白酶部分消化该融合蛋白,从而由其释放该重组蛋白。该释放的蛋白可随后通过后续的层析分离从该融合结构域分离出来。在某些优选实施方式中,ActRII多肽与能使该ActRII多肽在体内稳定的结构域(“稳定剂”结构域)相融合。“稳定化”表示增加血清半衰期的任意情况,而不论它是由破坏减少、肾清除率降低或其它药代动力学作用所引起。与免疫球蛋白的Fc区融合已知能对多种蛋白赋予所需药代动力学特性。同样地,与人血清白蛋白的融合可赋予所需特性。其它可供选择的融合结构域类型包括多聚化(例如,二聚化、四聚化)结构域和功能结构域(其赋予附加的生物功能,例如对肌肉生长的进一步刺激)。

[0092] 作为特殊的实例,本发明提供了包含与Fc结构域融合的ActRIIa的可溶胞外结构域的融合蛋白(例如,SEQ ID NO:6)。

[0093] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)
VSNKALPVPPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

[0094] 作为另外的特殊实例,本发明提供了包含与Fc结构域融合的ActRIIb的可溶胞外结构域的融合蛋白(例如,SEQ ID NO:21)。

[0095]

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCLDDFNCYDRQECVATEE
NPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEK
TIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0096] 可选地,该Fc结构域在例如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434等残基具有一个或多个突变。在某些情况下,具有一个或多个这些突变(例如,Asp-265突变)的突变体Fc结构域与

Fc γ 受体的结合能力相对于野生型Fc结构域有所下降。在其它情况下,具有一个或多个这些突变(例如,Asn-434突变)的该突变体Fc结构域与I类MHC相关的Fc-受体(FcRN)的结合能力相对于野生型Fc结构域有所上升。

[0097] 可以理解该融合蛋白的不同元件可以与所需功能一致的任意方式排列。例如,ActRII多肽可放在异源结构域的C-末端,或者替代性地,异源源结构域可放在ActRII多肽的C-末端。该ActRII多肽结构域和该异源结构域无需在融合蛋白中彼此接近,在任一结构域的C-或N-末端或者在结构域之间可包含另外的结构域或氨基酸序列。

[0098] 在某些实施方式中,本发明的ActRII多肽包含能够稳定该ActRII多肽的一种或多种修饰。例如,这些修饰提高该ActRII多肽的体外半衰期,提高该ActRII多肽的循环半衰期或减少该ActRII多肽的蛋白酶水解降解。这些稳定化修饰包括,但不限于,融合蛋白(包括,例如,包含ActRII多肽和稳定剂结构域的融合蛋白),糖基化位点的修饰(包括,例如,向ActRII多肽添加糖基化位点),以及糖部分的修饰(包括,例如,从ActRII多肽除去糖部分)。本文所用的术语“稳定剂结构域”不仅指融合蛋白情况下的融合结构域(例如,Fc),还包括非蛋白质性质的修饰,例如糖部分,或非蛋白质性质的部分,例如聚乙二醇。

[0099] 在某些实施方式中,本发明提供了ActRII多肽的分离和/或纯化形式,其分离自其他蛋白,或者基本不含其它蛋白。ActRII多肽通常可通过从重组核酸表达生成。

[0100] 3. 编码ActRII多肽的核酸

[0101] 在某些方面,本发明提供了编码本文披露的任意ActRII多肽(例如,可溶ActRIIa多肽和可溶ActRIIb多肽),包括片段、功能变体和融合蛋白的分离和/或重组核酸。例如,SEQ ID NO:4编码天然存在的人ActRIIa前体多肽,而SEQ ID NO:5编码加工后的ActRIIa胞外结构域。例如,SEQ ID NO:18编码天然存在的人ActRIIb前体多肽,而SEQ ID NO:19编码加工后的ActRIIb胞外结构域。所述主题核酸可以是单链的或是双链的。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可以在,例如,制备ActRII多肽的方法中使用,或者直接作为治疗剂(例如,在基因治疗方法中)使用。

[0102] 在某些方面,编码ActRIIa多肽的主题核酸应进一步理解为包括为SEQ ID NO:4或5的变体的核酸。在某些方面,编码ActRIIb多肽的主题核酸应进一步理解为包括为SEQ ID NO:18或19的变体的核酸。变体核苷酸序列包括区别为一个或多个核苷酸置换、添加或删除的序列,例如等位基因变体。

[0103] 在某些实施方式中,本发明提供了与SEQ ID NOs:4、5、18或19具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的分离或重组核酸序列。本领域普通技术人员将能理解:与SEQ ID NOs:4、5、18或19互补的核酸序列,以及SEQ ID NOs:4、5、18或19的变体同样在本发明的范围之内。在进一步的实施方式中,本发明的核酸序列可被分离、重组和/或与异源核苷酸序列融合,或者在DNA库中。

[0104] 在其它实施方式中,本发明的核酸还包括在高度严格的条件下与SEQ ID NOs:4、5、18或19中所示的核苷酸序列、SEQ ID NOs:4、5、18或19的互补序列或其片段进行杂交的核苷酸序列。如上文所讨论,本领域普通技术人员将容易理解:促进DNA杂交的合适的严格条件是可以变化的。本领域普通技术人员将容易理解:促进DNA杂交的合适的严格条件是可以变化的。例如,可在6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)和约45℃下杂交,然后在2.0x SSC和50℃下洗涤。例如,在该洗涤步骤中的盐浓度可从低严格性的50℃下约2.0x SSC至高严格性的

50℃下约0.2x SSC中选择。此外,该洗涤步骤中的温度可从低严格性的约22℃的室温上升至高严格条件下的约65℃。温度和盐均可变化,或者可将温度或盐浓度保持恒定,而改变其它变量。在一个实施方式中,本发明提供在6x SSC和室温的低严格条件下杂交,然后在2x SSC和室温下洗涤的核酸。

[0105] 由于遗传密码的简并而不同于SEQ ID NOs:4、5、18或19所示核酸的分离核酸同样在本发明的范围内。例如,有一个以上的三联体(triplet)表示了一系列核酸。表示相同氨基酸的密码子,或者同义密码子(例如,CAU和CAC为组氨酸的同义密码子)可导致“沉默”突变,其不影响该蛋白的氨基酸序列。然而,可以预期在哺乳动物细胞中存在可导致该主题蛋白(subject protein)的氨基酸序列变化的DNA序列多态性。本领域技术人员将能理解:在编码特定蛋白的核酸的一个或多个核苷酸(多达约3-5%的核苷酸)的这些变化可能由于天然等位基因变化在给定物种的个体中存在。这些核苷酸变化的任意一个或全部以及所得的氨基酸多态性均在本发明的范围之内。

[0106] 在某些实施方式中,本发明的重组核酸可以在表达构建体中可操作地连接至一种或多种调节性核苷酸序列。调节性核苷酸序列通常适合用于表达的宿主细胞。本领域已知针对各种宿主细胞的多种合适的表达载体类型以及合适的调节性序列。所述一种或多种调节性核苷酸序列通常可包括,但不限于,启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或活化子序列。本领域已知的组成型或可诱导启动子在本发明的预期之中。该启动子可以是天然存在的启动子,或者是合并了一个以上启动子的元件的杂交启动子。表达构建体可存在于细胞中的游离体(例如质粒)上,或者该表达构建体可插入染色体。在优选的实施方式中,该表达载体包含选择性标记基因,从而允许选择转化的宿主细胞。选择性标记基因已为本领域公知,并将随着所用的宿主细胞而变化。

[0107] 在本发明某些方面,包含编码ActRII多肽的核苷酸序列并可操作地连接至至少一个调节性序列的表达载体中提供该主题核酸(the subject nucleic acid),。调节性序列已为本领域所了解,并可选择用于引导该ActRII多肽的表达。因此,术语调节性序列包括启动子、增强子以及其它表达控制元件。示范性的调节性序列描述于Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如,各种在与DNA序列可操作地连接时能控制该DNA表达的表达控制序列中的任意一种可用于这些载体中,以表达编码ActRII多肽的DNA序列。这些有用的表达控制序列包括,例如,SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒和细胞巨化病毒即时早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、由T7 RNA聚合酶引导表达的T7启动子、噬菌体lambda的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖分解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子,例如,Pho5、酵母 α -交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子以及控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列,及其各种组合。应当理解,表达载体的设计可能依赖于待转化的宿主细胞的选择和/或需要表达的蛋白的类型等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力以及由该载体编码的任意其它蛋白(例如抗生素标记)的表达。

[0108] 本发明的重组核酸可通过将克隆的基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体后生成。生产重组ActRII多肽的表达

载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括如下类型的质粒:可在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的pBR322-衍生质粒、pEMBL-衍生质粒、pEX-衍生质粒、pBTac-衍生质粒以及pUC-衍生质粒。

[0109] 部分哺乳动物表达载体同时包含促进载体在细菌中增殖的原核序列和一种或多种在真核细胞中表达的真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生载体是适于真核细胞转染的哺乳动物细胞表达载体的实例。这些载体中部分以来自细菌质粒(如pBR322)的序列进行修饰,以促进在原核和真核细胞中的复制和药物耐受选择。或者,病毒的衍生物如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或Epstein-Barr病毒(pHEBo, pREP-衍生和p205)可用于在真核细胞中蛋白的瞬时表达。其它病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可在下文有关基因治疗传递系统的描述中发现。用于制备质粒和转化宿主生物的各种方法已为本领域公知。其它合适的原核和真核细胞表达系统以及一般的重组步骤可参见Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在某些情况下,可能需要采用杆状病毒表达系统来表达该重组多肽。这些杆状病毒表达系统的实例包括pVL-衍生载体(例如pVL1392, pVL1393和pVL941)、pAcUW-衍生载体(例如pAcUW1)以及pBlueBac-衍生载体(例如含 β -gal的pBlueBac III)。

[0110] 在优选的实施方式中,将设计在CHO细胞中生成该主题ActRII多肽的载体,例如Pcmv-Script载体(Stratagene, La Jolla, Calif)、pcDNA4载体(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)和pCI-neo载体(Promega, Madison, Wisc)。显而易见地,该主题基因构建体可用于引发该主题ActRII多肽在培养中增殖的细胞中的表达,例如,以生成蛋白,包括融合蛋白或变体蛋白,以供纯化。

[0111] 本公开还涉及以包含一种或多种该主题ActRII多肽的编码序列(例如,SEQ ID NO:4、5、18或19)的重组基因转染宿主细胞。该宿主细胞可以是原核或真核细胞。例如,本发明的ActRII多肽可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞(例如,采用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞已为本领域技术人员所了解。

[0112] 因此,本发明进一步涉及生成该主题ActRII多肽的方法。例如,以编码ActRIIa或ActRIIb多肽的表达载体转染的宿主细胞可在适于该多ActRII肽表达的适当条件下培养。该ActRII多肽可被分泌并从细胞和含有该ActRII多肽的培养基的混合物中分离。或者,该ActRII多肽可保留在细胞质内或者在膜组分中,并收集、溶解该细胞并分离蛋白。细胞培养物包含宿主细胞、培养基和其它副产物。细胞培养的合适培养基已为本领域公知。该主题ActRII多肽可从细胞培养基、宿主细胞或两者中采用本领域已知的纯化蛋白的技术分离,该技术包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、通过特异性针对该ActRII蛋白的特定表位的抗体进行免疫亲和纯化以及通过结合与该ActRII多肽融合的结构域的药剂进行亲和纯化(例如,蛋白A柱可用于纯化ActRIIa-Fc或ActRIIb-Fc融合体)。在优选的实施方式中,ActRII多肽是包含促进其纯化的结构域的融合蛋白。在优选的实施方式中,纯化可通过一系列的柱层析步骤实现,包括,例如,以任意顺序排列的以下三种或以上的步骤:蛋白A层析、Q琼脂糖层析、苯基琼脂糖层析、尺寸排阻层析以及阳离子交换色谱。该纯化可通过病毒过滤和缓冲液交换完成。如本文所示,ActRIIa-hFc蛋白被纯化至以尺寸排阻层析测得的>

98%的纯度和用SDS PAGE测得的>95%的纯度。该纯度水平足以在小鼠、大鼠和非人灵长动物中实现所需的结果。

[0113] 在另一实施方式中,编码纯化前导序列的融合基因,例如在重组ActRII多肽的所需部分N末端的多-(His)/肠激酶切割位点序列,可允许通过亲和层析采用Ni²⁺金属树脂来纯化表达的融合蛋白。然后该纯化前导序列可通过用肠激酶处理去除,以提供纯化的ActRII多肽(例如,参见Hochuli等人,(1987)J.Chromatography 411:177;和Janknecht等人,PNAS USA 88:8972)。

[0114] 制备融合基因的技术已经公知。基本上,参经常规技术连接编码不同多肽序列的各种DNA片段,采用平头或交错末端进行连接,以限制酶消化提供合适的末端,根据需要填补粘性末端,碱性磷酸酶处理以避免不必要的连接,然后酶连接。在另一实施方式中,该融合基因可通过包括自动化DNA合成仪等常规技术合成。替代性地,可使用在两个连续基因片段之间产生互补性悬挂的锚定引物进行基因片段的PCR扩增,此两个连续基因片段随后可退火形成嵌合基因序列(例如,参见Current Protocols in Molecular Biology, eds.Ausubel等人,John Wiley&Sons:1992)。

[0115] 4. 替代性活化素和ActRII拮抗剂

[0116] 本文所示的数据证明了活化素-ActRII信号传导的拮抗剂可用于提高红细胞或血红蛋白水平。尽管可溶ActRIIa和ActRIIb多肽,特别是ActRIIa-Fc和ActRIIb-Fc是优选的拮抗剂,且尽管该种拮抗剂可通过非活化素拮抗的机制影响红细胞水平(例如,活化素抑制可以是一种药剂抑制一系列分子活性的倾向的指示,该分子有可能包括TGF-β超家族的其它成员,且该种集体抑制可得到造血作用的所需影响),其它类型的活化素-ActRII拮抗剂预期也是有用的,包括抗-活化素(例如,活化素BA、BB、BC和BE)抗体,抗-ActRIIa抗体,抗-ActRIIb抗体,抑制ActRIIa和/或ActRIIb生成的反义、RNAi或者核酶核酸,以及其它的活化素、ActRIIb或ActRIIa抑制剂,特别是破坏活化素-ActRIIa和/或活化素-ActRIIb结合的那些。

[0117] 与ActRII多肽(例如,可溶ActRIIa或ActRIIb多肽)特异性反应,并与ActRII多肽竞争性结合配体或者抑制ActRII-介导的信号传导的抗体可用作ActRII多肽活性的拮抗剂。同样地,与活化素BA、BB、BC或BE多肽或其任何异源二聚体特异性反应并破坏ActRIIa和/或ActRIIb结合的抗体可用作拮抗剂。

[0118] 使用由ActRIIa多肽、ActRIIb多肽或活化素多肽衍生的免疫原,可通过标准方法制备抗蛋白/抗肽抗血清或单克隆抗体(例如,参见Antibodies:A Laboratory Manual ed.by Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press:1988))。哺乳动物如小鼠、仓鼠或兔可通过活化素、ActRIIa或ActRIIb多肽的免疫原形式、能够引发抗体应答的抗原性片段或融合蛋白进行免疫。给蛋白或肽赋予免疫原性的技术包括与载体结合或本领域公知的其它技术。ActRII或活化素多肽的免疫原部分可在佐剂的存在下进行施用。免疫的进展可通过检测血浆或血清中的抗体效价进行监测。标准的ELISA或其它免疫测定可以免疫原作为抗原评估抗体水平。

[0119] 在以活化素、ActRIIa或ActRIIb多肽的抗原性制备物免疫动物后,可获得抗血清,且在需要时可从该血清中分离多克隆抗体。为了生成单克隆抗体,可从免疫后的动物采集抗体生成细胞(淋巴细胞),并通过标准的体细胞融合步骤与永生细胞如骨髓瘤细胞融合以

获得杂交瘤细胞。这些技术已为本领域公知,其包括,例如,通过杂交瘤技术(最初开发:Kohler and Milstein,(1975)Nature,256:495-497)、人B细胞杂交瘤技术(Kozbar等人,(1983)Immunology Today,4:72)以及EBV-杂交瘤技术来生成单克隆抗体(Cole等人,(1985)Monoclonal Antibodies and CancerTherapy,Alan R.Liss,Inc.pp.77-96)。可通过免疫化学筛选获得生成与活化素、ActRIIa或ActRIIb多肽特异性反应的抗体的杂交瘤细胞,并从包含该种杂交瘤细胞的培养物分离单克隆抗体。

[0120] 本文所用的术语“抗体”意在包括完整的抗体,例如任意抗体同种型(IgG、IgA、IgM、IgE等),并且包括与选定抗原反应的免疫球蛋白的片段或结构域。抗体可通过常规技术分段,并根据实用性和/或与目标特异性表位的相互作用筛选片段。因此,该术语包括能够与特定蛋白选择性反应的抗体分子的蛋白酶水解裂解片段或重组制备的部分。这种蛋白水解和/或重组的片段的非限制性实例包括Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv以及包含通过肽接头连接的V[L]和/或V[H]结构域的单链抗体(scFv)。该scFv可共价或非共价连接形成具有两个或多个结合位点的抗体。术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体或抗体和重组抗体的其它纯化制备物。术语“重组抗体”表示由分子生物学技术构建的核酸表达的抗体或免疫球蛋白的抗原结合结构域,例如从单链抗体开发的人源化抗体或全人源抗体。单结构域和单链抗体通常包括在术语“重组抗体”之内。

[0121] 在某些实施方式中,本发明的抗体为单克隆抗体,在某些实施方式中,本发明提供了生成新型抗体的方法。例如,生成特异性结合ActRIIa多肽、ActRIIb多肽或活化素多肽的单克隆抗体的方法可包括向小鼠施用一定量的包含了能有效刺激可测免疫应答的抗原多肽的免疫原性组合物,从该小鼠获得抗体生成细胞(例如,来自脾的细胞)并将该抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合获得抗体生成的杂交瘤,并测试该抗体生成杂交瘤,以鉴定能生成可特异性结合该抗原的单克隆抗体的杂交瘤。杂交瘤在获得后可在细胞培养中增殖,任选采用杂交瘤衍生细胞生成特异性结合该抗原的单克隆抗体的培养条件。该单克隆抗体可从该细胞培养物纯化。

[0122] 形容词“与...特异性反应”在形容抗体时如本领域的一般理解,表示该抗体在目标抗原(例如活化素、ActRIIa或ActRIIb多肽)与其它非目标抗原之间具有足够的选择性,使得该抗体至少可用于在具体类型的生物样本中检测该目标抗原的存在。在使用该抗体的某些方法(例如,治疗性应用)中,可能需要更高程度的结合特异性。单克隆抗体通常具有更强的在目标抗原和交叉反应性多肽之间有效区分的趋势(与多克隆抗体相比)。影响抗体:抗原相互作用特异性的一个特征是该抗体对该抗原的亲合性。尽管可通过一定范围的不同亲合性实现所需的特异性,一般优选抗体具有约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M或更小的亲合性(解离常数)。

[0123] 此外,用于筛选抗体以鉴定所需抗体的技术也能影响所得抗体的特性。例如,如果抗体是用于在溶液中结合抗原,它可能需要测试溶液结合。已有多种不同的技术来测试抗体和抗原之间的相互作用,以鉴定具体目标抗体。这些技术包括ELISA、表面等离子共振结合测定(例如,BiacoreTM结合测定,Biacore AB,瑞典Uppsala)、夹心测定(例如,顺磁珠系统,IGEN International,Inc.,Gaithersburg,Maryland)、western印迹、免疫沉淀测定以及免疫组化。

[0124] 作为活化素或ActRII拮抗剂的核酸化合物类别的实例包括反义核酸、RNAi构建体

和催化性核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可包含悬挂或非互补区,其中一条链为单链的。单链化合物可包含自身互补区,表示该化合物以双链螺旋结构区形成所谓的“发夹”或“茎环”结构。核酸化合物可包含与该全长ActRII核酸序列或活化素BA、BB、BC或BE核酸序列的不超过1000个、不超过500个、不超过250个、不超过100个或不超过50、35、25、22、20、18或15个核苷酸组成的区域互补的核苷酸序列。该互补区域优选至少8个核苷酸,并任选约18至35个核苷酸。互补区域可在内含子中,后者是目标转录物的编码序列或非编码序列,例如编码序列部分。一般而言,核酸化合物可具有约8至约500核苷酸或碱基对的长度,且任选该长度为约14至约50核苷酸。核酸可以是DNA(特别是用作反义时)、RNA或RNA:DNA杂交体。任意一条链可包括DNA和RNA的混合物以及不能简单分类为DNA或RNA的修饰形式。同样地,双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA,且任意一条链也可包含DNA和RNA的混合物以及不能简单分类为DNA或RNA的修饰形式。核酸化合物可包含各种修饰的任意一种,包括对骨架(在天然核酸中的糖-磷酸酯部分,包括核苷酸间连锁)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一个或多个修饰。反义核酸化合物将优选具有约15至约30个核苷酸的长度,并通常包含一个或多个修饰以改善其特征,例如在血清、在细胞或在该化合物可能传递位置(例如口服传递化合物时的胃中和吸入化合物时的肺中)的稳定性。对于RNAi构建体的情况,与目标转录物互补的链通常为RNA或其修饰体。另一条链可以是RNA、DNA或任意其它变体。双链或单链“发夹”RNAi构建体的双链体部分通常具有18-40个氨基酸的长度,任选约21-23核苷酸的长度,只要其用作Dicer底物。催化性或酶催化性核酸可以是核酶或DNA酶,并且还可包含修饰的形式。核酸化合物可在生理条件下并以无义或正义控制作用很小或没有作用的浓度下与细胞接触时抑制约50%、75%、90%或更多的目标表达。用于测试核酸化合物作用的优选浓度为1、5和10微摩尔。还可测试核酸化合物对例如,红细胞水平的作用。

[0125] 5. 筛选测定

[0126] 在某些方面,本发明涉及ActRII多肽(例如,可溶性ActRIIa或ActRIIb多肽)和活化素多肽鉴定作为活化素-ActRIIa和/或活化素-ActRIIb信号传导途径激动剂或拮抗剂的化合物(药剂)的应用。可测试通过该测定鉴定的化合物,以评估它们在体内或体外调节红细胞、血红蛋白和/或网织红细胞水平的能力。这些化合物可以在,例如,动物模型中测试。

[0127] 有多种方法可以筛选通过靶向活化素和ActRII信号传导来提高红细胞或血红蛋白水平的治疗剂。在某些实施方式中,可进行化合物的高通量筛选来鉴定在选定细胞系扰乱活化素或ActRII-介导的作用的药剂。在某些实施方式中,可实施该测定以筛选并鉴定特异性抑制或减少ActRIIa或ActRIIb多肽与活化素的结合的化合物。替代性地,该测定可用于鉴定增加ActRIIa或ActRIIb多肽与活化素的结合的化合物。在进一步的实施方式中,化合物可通过其与活化素、ActRIIb多肽或ActRIIa多肽相互作用的能力来鉴定。

[0128] 多种测定形式可满足需要,且根据本公开,未在本文明示的测定可被本领域普通技术人员所理解。如本文所述,本发明的测试化合物(药剂)可通过任意组合的化学方法生成。替代性地,该主题化合物(the subject compound)可以在体内或体外合成的天然存在的生物分子。用于测试其作为组织生长调节剂的能力的待测试化合物(药剂)可通过,例如,细菌、酵母、植物或其它生物生成(例如,天然产物),通过化学方法生成(例如,小分子,包括拟肽)或通过重组生成。本发明预期的测试化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、拟

肽、糖、激素和核酸分子。在特殊的实施方式中,该测试药剂是分子量小于约2000道尔顿的小有机分子。

[0129] 本发明的测试化合物可以单独的、分散的实体提供,或者在更复杂的库中提供,例如通过组合化学制备。这些库可包含,例如,醇、卤代烷、胺、酰胺、酯、醛、醚和其它有机化合物类别。测试化合物可在测试系统(特别是在初始筛选步骤中)以分离形式或化合物混合物的方式存在。可选地,该化合物任选可与其它化合物衍生化,并具有促进该化合物分离的衍生化基团。衍生化基团的非限制性实例包括,生物素、荧光素、地高辛、绿色荧光蛋白、同位素、聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S转移酶(GST)、光激活交联剂或其任意组合。

[0130] 在许多对化合物和天然提取物库进行测试的药物筛选程序中均要求使用高通量测定,从而使给定时间范围内所考察的化合物数量达到最大化。在无细胞系统中进行的测定(如通过纯化或半纯化蛋白得到)常被优选为“初级”筛选,通过该筛选可对由测试化合物介导的目标分子的改造进行快速开发和相对简便的检测。此外,测试化合物的细胞毒效应或生物相容性效应通常在体外系统中可被忽略,从而使测定可以主要集中在药物对分子目标的作用,其可通过ActRIIa多肽与活化素之间和/或ActRIIb多肽和活化素之间的结合亲和性的改造所显示。

[0131] 仅为阐述目的,在本发明的示范性筛选测定中,该目标化合物与分离和纯化的ActRIIa多肽(其通常能够结合活化素)相接触。然后向该化合物与ActRIIa多肽的混合物中添加含有ActRIIa配体的组合物。对ActRIIa/活化素复合物的检测和定量为测定化合物抑制(或促进)ActRIIa多肽和活化素之间复合物形成的效力提供了方法。该化合物的效力可通过由不同浓度的该测试化合物所得的数据生成剂量应答曲线后进行评估。此外,还可进行对照测定以提供比较基线。例如,在对照测定中,向含有该ActRIIa多肽的组合物中添加分离和纯化的活化素,并在该测试化合物缺失的情况下对ActRIIa/活化素复合物的形成进行定量。应当理解,一般而言混合反应物的顺序可以变化,并且可以同时混合。此外,细胞萃取物和溶解产物可取代纯化蛋白来提供合适的无细胞测定系统。影响ActRIIb信号传导的化合物可采用ActRIIb多肽和ActRIIb配体通过类似的方式进行鉴定。

[0132] ActRII多肽和活化素之间的复合物形成可通过多种技术检测。例如,可采用,例如,可测标记蛋白如放射性标记的(例如, ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H)、荧光标记的(例如,FITC)或酶标记的ActRIIa或ActRIIb多肽或活化素,通过免疫测定或通过色谱检测对复合物形成的调节进行定量。

[0133] 在某些实施方式中,本发明预期使用荧光极化测定和荧光共振能量转移(FRET)测定来直接或间接测量ActRII多肽和它的结合蛋白之间的相互作用程度。此外,其它检测模式,例如基于光波导(PCT公布WO 96/26432和美国专利5,677,196)、表面等离子共振(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器的检测,可适用于本发明的多种实施方式。

[0134] 此外,本发明预期相互捕获测定(也称为“双杂交测定”)来鉴定破坏或促进ActRII多肽及其结合蛋白之间的相互作用的药剂的应用。例如,参见,美国专利5,283,317;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;以及Iwabuchi等人(1993)Oncogene 8:1693-1696)。在特别的实施方式中,本发明预期逆双杂交系统来鉴定分离ActRII多肽及其结合蛋白之间的相互作用的化合物(例如,小分子或肽)的应用。例如,参见Vidal和Legrain,

(1999)NucleicAcids Res 27:919-29;Vidal和Legrain,(1999)Trends Biotechnol 17:374-81;以及美国专利5,525,490;5,955,280;和5,965,368。

[0135] 在某些实施方式中,可通过与本发明的ActRII或活化素多肽相互作用的能力来鉴定主题化合物。化合物与ActRIIa、ActRIIb或活化素多肽之间的相互作用可以是共价或非共价的。例如,这种相互作用可通过体外生物化学方法在蛋白水平下鉴定,所述生物化学方法包括光交联、放射标记的配体结合以及亲和层析(JakobyWB等人,1974,Methods in Enzymology 46:1)。在某些情况下,该化合物可通过基于机制的测定(例如检测结合活化素或ActRII多肽的化合物的测定)进行筛选。这可包括固相或液相结合事件。替代性地,该编码活化素或ActRII多肽的基因可通过报告系统(例如, β -半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白)转染进入细胞,并可选地通过高通量筛选对库进行筛选或对库的个别成员进行筛选。可使用其它的基于机制的结合测定,例如,检测自由能变化的结合测定。可在靶标被固定至微孔、珠或芯片或者被固定化抗体捕获或者被毛细管电泳分辨的情况下实施结合测定。结合化合物通常可采用比色或荧光或表面等离子共振等方法检测。

[0136] 6. 示范性治疗用途

[0137] 在某些实施方式中,本发明的活化素-ActRII拮抗剂(例如ActRIIa或ActRIIb多肽)可用于在哺乳动物(如啮齿动物和灵长动物,特别是在人类患者)中提高红细胞水平。在某些实施方式中,本发明提供了通过向有此需要的个体施用治疗有效量的活化素-ActRIIa拮抗剂(例如ActRIIa多肽)或者治疗有效量的活化素-ActRIIb拮抗剂(例如ActRIIb多肽)治疗或预防个体贫血的方法。在某些实施方式中,本发明提供了通过向个体施用治疗有效量的活化素-ActRII拮抗剂(特别是ActRII多肽)促进该个体中红细胞形成的方法。这些方法可用于对哺乳动物(特别是人)的治疗性或预防性治疗。

[0138] 本文所用的“防止”疾病或病症的治疗指化合物在统计样本中相对未治疗对照样本可减少治疗样本中的疾病或病症的发生,或者相对未治疗样本可延缓该疾病或病症的一种或多种症状的发作或减少其严重性。本文所用的术语“治疗”包括预防指定的病症或者在其形成后改善或消除该病症。在任一情况下,预防或治疗可在医师或其他健康护理提供商所提供的诊断或者该治疗剂的施用的预期结果中得到区分。

[0139] 如本文所示,活化素-ActRIIa拮抗剂和活化素-ActRIIb拮抗剂可用于提高健康个体的红细胞、血红蛋白或网织红细胞水平,且这些拮抗剂可用于选定的患者群体。合适的患者群体的实例包括具有不良的低红细胞或血红蛋白水平的患者,例如患有贫血的患者,以及具有形成不良的低红细胞或血红蛋白水平的风险的患者,例如将要进行可导致大量失血的大外科手术或其它过程的患者。在一个实施方式中,可采用活化素-ActRIIa拮抗剂治疗具有足够红细胞水平的患者以提高红细胞水平,然后抽出血液并贮存,供以后输血使用。在一个实施方式中,可采用活化素-ActRIIb拮抗剂治疗具有足够红细胞水平的患者以提高红细胞水平,然后抽出血液并贮存,供以后输血使用。

[0140] 本文披露的活化素-ActRII拮抗剂,特别是ActRIIa-Fc和ActRIIb蛋白,可用于提高患有贫血的患者中的红细胞水平。当在患者中观察血红蛋白水平时,尽管考虑个体差异,低于该适当的年龄和性别组正常值的水平可作为贫血的指标。例如,12g/dl的血红蛋白水平通常认为是一般成年群体中的正常值的下限。潜在的诱因包括失血、营养缺乏、药物反应、与骨髓和多种疾病有关的各种问题。更具体而言,贫血与多种疾病相关,其包括,例如,

慢性肾功能衰竭、骨髓增生异常综合征、类风湿关节炎以及骨髓移植。贫血还可与如下病症有关：实体肿瘤（例如，乳腺癌、肺癌、结肠癌）；淋巴系统的肿瘤（例如，慢性淋巴细胞白血病、非何杰金氏和何杰金氏淋巴瘤）；造血系统的肿瘤（例如，白血病、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤）；放射性治疗；化学治疗（例如，含铂方案）；炎症和自身免疫疾病，包括但不限于，类风湿性关节炎，其它炎症性关节炎，系统性红斑狼疮（SLE），急性或慢性皮肤疾病（例如，牛皮癣），炎性肠道疾病（例如，Crohn疾病和溃疡性结肠炎）；急性或慢性肾脏疾病或衰竭，包括原发性或先天病症；急性或慢性肝脏疾病；急性或慢性出血；由于患者的异-或自身-抗体和/或由于宗教原因（例如，某些耶和华见证人）而不能输注红细胞的情况；感染（例如，疟疾，骨髓炎）；血红蛋白病，包括，例如，镰形细胞疾病，地中海贫血；药物使用或滥用，例如，乙醇误用；由于任何避免输血的原因导致的贫血的小儿科患者；以及由于担心循环过载导致的不能接受输血的患贫血的年长患者或心肺疾病患者。

[0141] 尽管较低的目标水平可引起较少的心血管副作用，可采用目的在于将患者恢复至目标血红蛋白水平的给药方案来治疗患者，该目标血红蛋白水平通常在约10g/dl和约12.5g/dl之间，通常约为11.0g/dl（也参见Jacobs等人（2000）*Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19）。替代性地，血细胞比容水平（该细胞占血液样本的体积百分比）可用作对红细胞病症的测量。对于健康个体的血细胞比容水平，成年男性的范围为41-51%，成年女性的范围为35-45%。目标血细胞比容水平通常约为30-33%。此外，血红蛋白/血细胞比容水平可随个体而变化。因此，最佳情况下，该目标血红蛋白/血细胞比容水平可针对每位患者进行个体化。

[0142] 本文披露的活化素-ActRIIa拮抗剂对红细胞水平的快速作用显示这些药剂可以不同于Epo的机制进行作用。因此，这些拮抗剂可用于对Epo不能良好应答的患者提高红细胞和血红蛋白水平。例如，活化素-ActRIIa拮抗剂可对施用正常至增加(>300IU/kg/周)的Epo剂量不能使血红蛋白水平上升至目标水平的患者有利。在各类的贫血中均发现了Epo应答不足的患者，而在癌症患者和末期肾病患者中特别频繁地发现了更多的非应答者。Epo的应答不足既可以是组成的（即，在第一次以Epo治疗时发现）或获得的（例如，以Epo重复治疗时发现）。

[0143] 活化素-ActRII拮抗剂还可用于治疗对Epo的副作用易感的患者。Epo的主要副作用为血细胞比容或血红蛋白水平的过量增加和红细胞增多。血细胞比容水平升高可导致高血压（更特别而言，高血压的加重）和脉管血栓症。业已报道的Epo的其它副作用（部分涉及高血压）为头痛、流行感冒样综合征、分流阻塞、心肌梗死和由于血栓症引起的脑惊厥、高血压性脑病、以及红细胞发育不全（Singibarti, (1994) *J. Clin Investig* 72(suppl 6), S36-S43; Horl等人(2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty等人(1997) *Neurology* 49, 686-689; Bunn(2002) *N Engl J Med* 346(7), 522-523）。

[0144] 7. 药物组合物

[0145] 在某些实施方式中，本发明的活化素-ActRII拮抗剂（例如，ActRIIa和ActRIIb多肽）可与药学上可接受的载体配制。例如，ActRII多肽可单独施用或作为药物制剂（治疗性组合物）的成分施用。该主题化合物可进行配制，从而以任意便利的方式作为人或兽药施用。

[0146] 在某些实施方式中，本发明的治疗性方法包括作为移植物或装置全身或局部施用

该组合物。在施用时,可在本发明使用的该治疗性组合物当然地呈无热原、生理可接受的形式。除了活化素-ActRII拮抗剂以外的治疗性有用的药剂还可以可选地包含在上述组合物中,并可在本发明的方法中与该主题化合物(例如,ActRIIa和ActRIIb多肽)同时或相继施用。

[0147] 活化素-ActRII拮抗剂通常可肠胃外施用。适合肠胃外施用的药物组合物可包含一种或多种ActRII多肽,联合一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,或者可在使用前被重组为无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末,其可包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、可使得该制剂与目标受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。可用于本发明的药物组合物的合适水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油,例如橄榄油,以及可注射有机酯,例如油酸乙酯。适当的流动性可通过多种方式维持,例如,通过使用卵磷脂等覆层物质,针对分散剂时对所需的颗粒尺寸的维持,以及通过表面活性剂的使用。

[0148] 此外,该组合物可被胶囊化或以可向目标组织部位(例如,骨髓)传递的形式注射。在某些实施方式中,本发明的组合物可包含能够将一种或多种治疗性化合物(例如,ActRIIa或ActRIIb多肽)传递至目标组织部位(例如,骨髓),为发育组织(developing tissue)提供结构并最佳地能够被身体再吸收的基质。例如,该基质可以提供ActRII多肽的缓慢释放。该种基质可由目前用于其它移植医学应用中采用的材料形成。

[0149] 基质材料的选择基于生物相容性、生物可降解性、机械性能、装饰性外观和界面属性。主题组合物的具体应用将限定适当的制剂。用于该组合物的潜在基质可以是可生物降解的和化学成分明确的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸和聚酐。其它潜在的材料为可生物降解的和生物成分明确的,例如骨或真皮胶原。其它的基质由纯蛋白或胞外基质成分所组成。其它的潜在基质为非可生物降解的和化学成分明确的,例如烧结羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可由任意上述材料类型的组合所构成,例如聚乳酸和羟基磷灰石或者胶原和磷酸三钙。生物陶瓷可更改组成,例如改为磷酸-铝酸-钙以及通过加工以改变孔径、颗粒大小、颗粒形状和生物降解性。

[0150] 在某些实施方式中,本发明的方法可以胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基底,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉末、颗粒、或作为含于水性或非水性液体中的溶液或悬浮液、或作为水包油或油包水的液体乳剂、或作为酞剂或糖浆、或作为软锭剂(使用惰性基底,例如明胶和甘油或者蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口液等形式进行施用,每种形式包含了预定数量的作为活性成分的药剂。该治疗剂还可作为药丸、干药糖剂或糊剂施用。

[0151] 在用于口服给药的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖锭、粉末、颗粒等)中,本发明的一种或多种治疗性化合物可与一种或多种药学上可接受的载体混合,该载体例如是柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或如下任意成分:(1)填充剂或扩充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)结合剂,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、土豆或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,例如石蜡;(6)吸收加速剂,例如季铵化合物;(7)润湿剂,例如,十六烷基醇和甘油单硬脂酸酯;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;以及

(10)着色剂。对于胶囊、片剂和丸剂,该药物组合物还可包含缓冲剂。相似类型的固体组合物还可作为软和硬-填充明胶胶囊的填充剂,采用乳糖或牛乳糖以及高分子量的聚乙二醇等作为赋形剂。

[0152] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性成分外,液体剂型还可包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(具体而言,棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油以及芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯类,及其混合物。除了惰性稀释剂,该口服组合物还可包含佐剂,例如润湿剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、气味剂和防腐剂。

[0153] 除了活性化合物外,悬浮液中可包含悬浮剂,例如乙氧基化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇以及山梨糖酯、微晶纤维素、甲基氢氧化铝、斑脱土、琼脂和黄芪胶,及其混合物。

[0154] 本发明的组合物还可包含佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。微生物作用的预防可通过各种抗菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等)实现。还可能需要在组合物中包含等渗剂,例如糖,氯化钠等。此外,可通过包含延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)实现该可注射药物形式的持续吸收。

[0155] 可以理解给药方案可由主治医师根据改变本发明主题化合物(例如,ActRIIa和ActRIIb多肽)的作用的各种因素来确定。所述各种因素包括,但不限于,患者的红细胞数,血红蛋白水平或其它诊断评估,所需的目标红细胞数,患者的年龄、性别和饮食,可导致红细胞水平下降的任意疾病的严重性、给药时间以及其它临床因素。向最终组合物中添加其它已知的生长因子也可能影响剂量。可通过周期性评估红细胞和血红蛋白水平,以及评估网织红细胞水平和其它的造血过程指示剂来监测进展。

[0156] 以灵长动物和人类进行的实验证实了以足够在至少约20-30天的期间内达到约100ng/ml或更高的血清浓度的间隔和数量下给用ActRIIa-Fc时,该化合物对红细胞水平的作用是可测的。也可采用能在至少20-30天的期间内达到200ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml或更高的血清水平的剂量。在约200ng/ml的血清水平下可观察到对骨骼的作用,而实质性作用起始于约1000ng/ml或更高,作用期限至少约20-30天。因此,如果想要实现对红细胞的作用,同时对骨骼产生较小的作用,给药方案可设计成在约20-30天的期间内递送在100和1000ng/ml之间的血清浓度。对于人类,200ng/ml的血清水平可通过0.1mg/kg或更高的单次剂量实现,而1000ng/ml的血清水平可通过0.3mg/kg或更高的单次剂量实现。对该分子观察到的血清半衰期在约20-30天之间,远长于大多数Fc融合蛋白,因此可通过,例如,每周或每两周给药约0.05-0.5mg/kg实现持续的有效血清水平,或者可在更长的给药间隔的情况下使用更高的剂量。例如,每月或每两月使用0.1-1mg/kg的剂量。

[0157] 在某些实施方式中,本发明还提供了用于体内生成ActRII多肽的基因治疗。该种治疗可通过将ActRIIa或ActRIIb多聚核苷酸序列导入具有上述列举的疾病的细胞或组织后实现其疗效。可采用重组表达载体(例如嵌合病毒或胶体分散系统)实现ActRII多聚核苷酸序列的传递。优选使用靶向脂质体进行ActRII多聚核苷酸序列的治疗性传递。

[0158] 本文教导的可用于基因治疗的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘或RNA病毒如逆转录病毒。该逆转录病毒载体可以是鼠或鸟逆转录病毒的衍生物。可插入单个外源

基因的逆转录病毒载体的实例包括,但不限于:Mooney鼠白血病病毒(MoMuLV)、Harvey鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳房肿瘤病毒(MuMTV)以及Rous肉瘤病毒(RSV)。一些其它的逆转录病毒载体可整合多种基因。所有这些载体可传递或整合选择性标记基因,从而可鉴别和生成转导的细胞。逆转录病毒载体可通过连接例如,糖、糖脂或蛋白而具有靶向特异性。优选通过使用抗体实现靶向作用。本领域技术人员将认识到,特定的多聚核苷酸序列可被插入该逆转录病毒基因组或连接至病毒包膜,以允许包含该ActRII多聚核苷酸的逆转录病毒载体的靶向特异性传递。

[0159] 或者,可采用编码该逆转录病毒结构基因gag、pol和env的质粒通过传统的磷酸钙转染直接转染组织培养细胞。然后以含有目标基因的载体质粒转染这些细胞。所得的细胞将该逆转录病毒载体释放进入培养基。

[0160] ActRII多聚核苷酸的另一靶向传递系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠以及基于脂质的系统(包括水包油乳液、微团、混合微团以及脂质体)。本发明优选的胶体系统为脂质体。脂质体是可在体外和体内用作传递载体的人工膜囊。RNA、DNA和完整的病毒粒子可被包封在水相内部,并以生物活性形式传递至细胞(例如,参见Fraley等人,TrendsBiochem.Sci.,6:77,1981)。使用脂质体载体有效传递基因的方法已为本领域所知,例如,参见Mannino等人,Biotechniques,6:682,1988。脂质体的组成通常为磷脂的组合,并常与类固醇(特别是胆固醇)联用。也可使用其它的磷脂或其它的脂质。脂质体的物理特征依赖于pH、离子强度以及二价阳离子的存在。

[0161] 可用于生成脂质体的脂质的实例包括磷脂酰基化合物,例如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂以及神经节苷脂。示范性的磷脂包括蛋磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱以及二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向作用还可能基于,例如,器官特异性、细胞特异性以及细胞器官特异性,并为本领域所知。

实施例

[0162] 现在将对本发明进行一般的描述,本发明可通过参考以下实施例容易地理解,包含该实施例的目的仅在于阐述某些实施方式和本发明的实施方式,而非意在限制本发明。

[0163] 实施例1:ActRIIa-Fc融合多肽

[0164] 申请人构建了可溶ActRIIa融合蛋白,其具有通过最小接头连接至人或小鼠Fc结构域的人ActRIIa胞外结构域。该构建体分别被称为ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc。

[0165] 从CHO细胞系统纯化得到的ActRIIa-hFc显示如下(SEQ ID NO:7):

[0166]

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDS
PEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP
IEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDSRWRQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0167] ActRIIa-hFc和ActRIIa-mFc蛋白可在CHO细胞系中表达。可考虑不同的前导序列:

[0168] (i)蜜蜂蜂毒肽(IIBML):MKFLVNLVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:8)

[0169] (ii)组织纤溶酶原激活剂(TPA):MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:9)

后分别为11 μ g/ml、110 μ g/ml或304 μ g/ml)。在短尾猴体内,该血浆半衰期远大于14天,且初始施用1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg后该药物的循环水平分别为25 μ g/ml、304 μ g/ml或1440 μ g/ml。

[0178] 实施例2:ActRIIa-hFc在非人灵长动物体内提高红细胞水平

[0179] 该研究共分四组,每组五只雄性和五只雌性短尾猴,其中计划在第29天停止每组每种性别中的三只,并计划在第57天停止每组每种性别中的两只。每只动物在第1、8、15和22天通过静脉(IV)注射施用载体(组1)或剂量为1、10或30mg/kg的ActRIIa-Fc(组2,3和4)。剂量体积维持在3mL/kg。在第一次施用前2天和第一次施用后15、29和57天(针对剩余两只动物)测量红细胞水平。

[0180] 在整个研究中的所有剂量水平和时间点下ActRIIa-hFc均引起了雄性和雌性体内平均红细胞参数(红细胞数[RBC],血红蛋白[HGB],血细胞比容[HCT])的统计学上显著升高,并伴有绝对和相对网织红细胞数(ARTC;RTC)的增加。参见图3-6。

[0181] 计算每个治疗组相对于该治疗组基线均值的统计显著性。

[0182] 明显的,红细胞数和血红蛋白水平的上升的幅度约等于对促红细胞生成素所报导的作用。ActRIIa-Fc的这些作用的开始比促红细胞生成素更为快速。

[0183] 在大鼠和小鼠中观察到了类似的结果。

[0184] 实施例3:ActRIIa-hFc在人类患者体内提高红细胞水平

[0185] 将实施例1中描述的融合蛋白在随机、双盲、安慰剂对照的研究中施用至人类患者,该研究主要用于评估该蛋白对健康、绝经后女性的安全性。48位对象被随机分为6组,以接受单剂量的ActRIIa-hFc或安慰剂(5活性:1安慰剂)。剂量水平范围为静脉(IV)0.01-3.0mg/kg,皮下(SC)0.03-0.1mg/kg。所有的对象均随访120天。除了药代动力学(PK)分析,还通过测量骨形成和再吸收的生物标记以及FSH水平来评估ActRIIa-hFc的生物活性。

[0186] 为了寻找潜在的变化,在研究过程中详细检查每个对象的血红蛋白和RBC数,并与基线水平进行比较。在相同的时间将血小板数与对照进行比较。血小板数随时间并未对基线值产生具有临床意义的变化。

[0187] 对ActRIIa-hFc的PK分析显示了与剂量呈线性的曲线,平均半衰期约为25-32天。ActRIIa-hFc的曲线下面积(AUC)与剂量线性相关,且在SC给药后的吸收基本完全(参见图7和8)。这些数据显示SC是理想的给药途径,因为它为该药物提供了等等的生物利用度和血清半衰期,同时避免了IV给药首几天内出现的药物血清浓度的峰值(见图8)。ActRIIa-hFc引起了骨特异性的碱性磷酸酶(BAP)(合成骨生长的标记)的血清水平的快速、持续的剂量依赖型上升,以及C末端1型胶原端肽和抗酒石酸酸性磷酸酶5b水平(骨再吸收的标记)的剂量依赖型下降。其它的标记(如PINP)显示了不确定的结果。BAP水平在最高药物剂量下显示接近饱和效应,表示在0.3mg/kg的剂量下可实现对该合成骨标记半最大效应,其可上升达3mg/kg。由药物的药效作用相对AUC的关系计算得到EC50为51,465(天*ng/ml)。参见图9。在所测试的最高剂量水平下,这些骨标记的变化持续约120天。与活化素的抑制相一致,血清FSH水平也存在剂量依赖型下降。

[0188] 整体而言,在研究的第一周仅有极少的非药物相关性血红蛋白减少,这可能与不管是IV还是SC给予的0.01和0.03mg/kg组的静脉切开放血研究相关。0.1mg/kg SC和IV血红蛋白结果在第8-15天保持稳定或者显示了略微的上升。在0.3mg/kg IV剂量水平,早达第2

天便可看到HGB水平的明显上升,并通常在第15-29天出现峰值,这在安慰剂对象中并未出现。在该研究点上,该变化未达到统计显著性。

[0189] 总体而言,ActRIIa-hFc显示了对红细胞数和网织红细胞数的剂量依赖型作用。对血液学变化的总结参见图10-13。

[0190] 实施例4:替代性ActRIIa-Fc蛋白

[0191] 公布为W02006/012627(例如,参见第55-58页)的国际专利申请中描述了多种可参照本文所述的方法使用的ActRIIa变体,其全文在此引入作为参考。替代性的构建体可删除C末端尾部(ActRIIa胞外结构域的最后15个氨基酸)。该种构建体的序列显示如下(Fc部分下划线显示)(SEQ ID NO:12):

[0192]

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDS
PEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0193] 实施例5:ActRIIb-Fc融合多肽

[0194] 申请人构建了可溶ActRIIb融合蛋白,其具有连接至人Fc结构域的人ActRIIb胞外结构域。活化素和胞外ActRIIb的共结晶结构未显示配体结合中的胞外结构域最后(C末端)15个氨基酸(此处称为“尾部”)的任何作用。该序列未能从晶体结构上分辨(resolve),提示这些残基存在于未均一填充在该晶体中的柔性环(flexible loop)中。Thompson等人EMBO J. 2003Apr1;22(7):1555-66。该序列在ActRIIb和ActRIIa之间保守性较差。因此,这些残基在基本的,或背景,ActRIIb-Fc融合构建体中缺失。此外,在背景形式的64号位置由丙氨酸占据,这通常被认为是“野生型”形式,尽管天然存在A64R等位基因。因此,背景ActRIIb-Fc融合体具有如下序列(Fc部分下划线显示)(SEQ ID NO:20):

[0195]

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEE
NPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0196] 令人惊奇的是,业已发现该C末端尾部增强了活化素和GDF-11结合,因此优选的ActRIIb-Fc形式具有如下序列(Fc部分下划线显示)(SEQ ID NO:21):

[0197]

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEE
NPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEK
TIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0198] 公布为W02006/012627(例如,参见第59-60页)的国际专利申请中描述了多种可参

照本文所述的方法使用的ActRIIb变体,其全文在此引入作为参考。

[0199] 实施例6:ActRIIb-hFc在非人类灵长动物体内刺激红细胞生成

[0200] 在1个月中每周一次通过皮下注射向雄性和雌性短尾猴施用ActRIIb-hFc(IgG1)。将48只短尾猴(24/性别)分配至四个治疗组(6动物/性别/组)中的一个,并在4周中每周一次皮下注射载体或者3、10或30mg/kg的ActRIIb-hFc(总共5个剂量)。评估参数包括一般临床病理学(血液学、临床化学、凝固和尿检)。ActRIIb-hFc在治疗动物中于第15天前引起了平均绝对网织红细胞值的统计显著性上升。至第36天,ActRIIb-hFc引起了多种血液学变化,包括上升的平均绝对网织红细胞和红细胞分布宽度值和下降的平均细胞血红蛋白浓度。所有治疗组别和两种性别均受到影响。这些作用与ActRIIb-hFc对来自骨髓的不成熟网织红细胞释放的阳性作用一致。当药物从被治疗动物体内清除后(至研究的第56天),这种作用被逆转。因此,我们总结认为ActRIIb-hFc刺激红细胞生成。

[0201] 引用参考

[0202] 本文所提及的所有公布和专利均全文引入作为参考,其引用程度如同每一个单独的公布和专利均被特别地和单独地引入作为参考。

[0203] 尽管已经讨论了该主题特殊的实施方式,以上的说明书仅作阐述之用,而不具有限制性。在阅读本说明书和以下权利要求书后,本发明的许多变型对于本领域技术人员而言将是显而易见的。本发明的完整范围应当参照权利要求书及其所有的等同范围以及说明书及各种变型得以确定。

序列表

<110> 阿塞勒隆制药公司

<120> 活化素-ACR11 拮抗剂及在提高红细胞水平中的用途

<130> PHPH-022-W01

<140> PCT/US07/025868

<141> 2007-12-18

<150> 60/875,682

<151> 2006-12-18

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

[0001] <213> 人

<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
[0002]	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

[0003]

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> 人

<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

```

[0004]

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<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> 人

<400> 4

[0005]

```

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtget 60
atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatgggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
tttgetacct ggaagaatat ttctgggttc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtcg 240
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccttgaagta 300
tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaacg cacctatta caacatcctg 420
ctctattcct tgggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttggc attttgggtg 480
tacaggcatc acaagatggc ctacctcct gtacttggtc caactcaaga ccaggacca 540
ccccacctt ctccattact agggttgaaa ccaactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcittaacg aatatgtggt tgtcaaaata 660
tttccaatac aggacaaaca gtcattggca aatgaatacg aagtctacag ttgtcctgga 720
atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840
gctaattgtg tctcttgtaa tgaactgtgt catattgcag aaacctggc tagaggattg 900
gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
agggacatca aaagtaaaaa tgtgtgtgtg aaaaacaacc tgacagcttg cattgtcgac 1020
tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataccca tggacaggtt 1080
ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140
gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtc tatgggaact ggcttctcgc 1200
tgtactgtcg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260
cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaa gaggcctgtt 1320
ttaagagatt attggcagaa acatgttgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
tgttgggata acgacgcaga agccaggta tcagctggat gtgtagggtg aagaattacc 1440
cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

```

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

```
atacttggta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
agaaccaate aaactgggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
tttgetacct ggaagaatat ttctgggtcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
tatttttggt getgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc 345
```

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

[0006]

<222> (43)

<223> Asp 或 Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (100)

<223> Lys 或 Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (212)

<223> His 或 Ala

<400> 6

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
  1           5           10          15

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

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

	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
	50					55						60					
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
	65				70					75					80		
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
				85					90					95			
	Tyr	Lys	Cys	Xaa	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Ile	Glu	Lys	
		100						105					110				
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
		115					120						125				
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
		130				135						140					
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
	145				150					155					160		
[0007]	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
				165					170						175		
	Asp	Ser	Asp	Gly	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				180					185					190			
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
		195					200						205				
	Ala	Leu	His	Xaa	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
		210				215						220					
	Lys																
	225																
	<210>	7															
	<211>	344															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	人工序列描述：合成构建体															

<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
 [0008]
 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

[0009] Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> 蜜蜂

<400> 8

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

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> 未知生物

<220>

<223> 未知生物描述：组织纤溶酶原激活物前导序列

<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> 未知生物

<220>

<223> 未知生物描述：天然前导序列

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys

1

5

10

15

[0010] Ser Ser Gly Ala

20

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Thr Gln Glu

1

5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成构建体

<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

[0011] 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

[0012]

<210> 13

<211> 369

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<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	
[0013]	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> 1114

<212> DNA

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 14

```
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tcgcccggcg cgcctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180
aacggcggca ttgttttgc tccctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
aggttggttg ctggtatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatattct gttgctgtga gggcaatatg tgtaaatgaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtea cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420
cggtggtgga actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
agtcctctc tttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt 540
cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt 600
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagcccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
caagtcaag gtctccaaca aagccctccc agtcccatc gagaaaacca tctccaagc 780
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg aggagatgac 840
caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga 960
ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaacgta ttctcatget ccgtgatgca tgaggetctg cacaaccact acacgcagaa 1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114
```

<210> 15

<211> 512

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

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

[0015] 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
[0016]	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> 16

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

[0017]

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> 17
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多肽

<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

[0018] 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> 18
 <211> 1539
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 18
 atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
 cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
 accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180
 gcctctctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaaggcctg ctggctagat 240
 gaattcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac 300
 ttctgtctgt gtgaaggcaa cttctgcaac gacgcgttca ctcatattgcc agaggctggg 360

```

ggccccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccc cctgtctcac ggtgctggcc 420
tactcaetge tgcccatcgg gggcctttcc ctcacgtcc tgcctggcctt ttggatgtac 480
cggcatcgca agcccccccta cggtcattgt gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
ccatccccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggggc 600
tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtgaa cgggagatct tcagcacacc tgccatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgtgtcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgtt ggcctgacct 1020
ggcttggctg ttccatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
acgagacggt acatggctcc tgaggtgtc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcttgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgtgtt gggagcttgt gtctcgtgc 1200
aaggtgtcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttctg tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaacaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgttgttcc gccggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggt cggtaacgg cactacctcg gactgtctcg ttccctgggt gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

[0019] <210> 19
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人

```

<400> 19
tctggggctg gggaggctga gacacgggag tgcatttact acaacgcaa ctgggagctg 60
gagcgcacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gccgctgcac 120
tgctacgcct cctgggcca aagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgtgtg 180
ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccactgagga gaacccccag 240
gtgtacttct gctgtgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttactca ttgccagag 300
gttggggggc cggaagtcac gtacgagcca ccccgacag cccccacc 348

```

<210> 20
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽
 <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	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
			100						105						110	
[0020]	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

[0021] <210> 21
<211> 344
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<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	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			
[0022]	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> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 22

[0023] Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 23

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

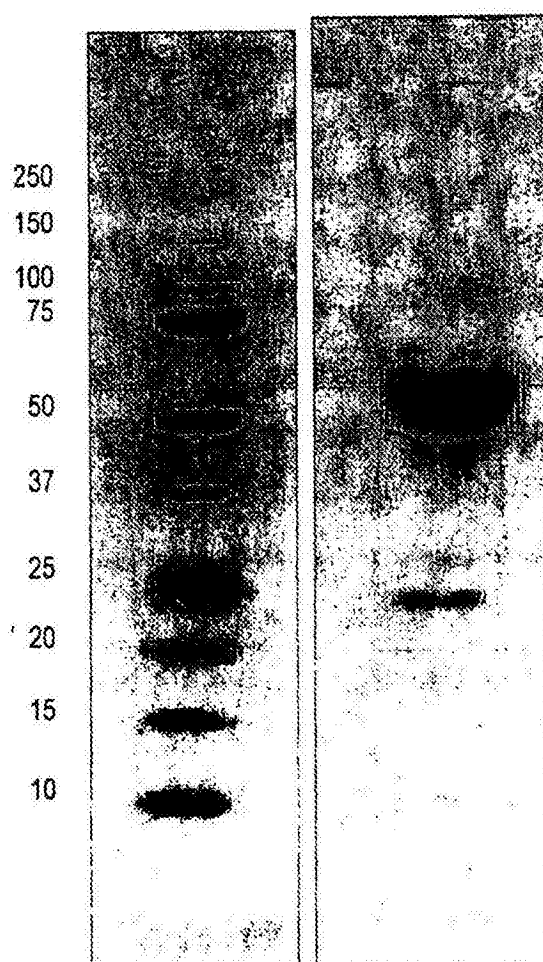
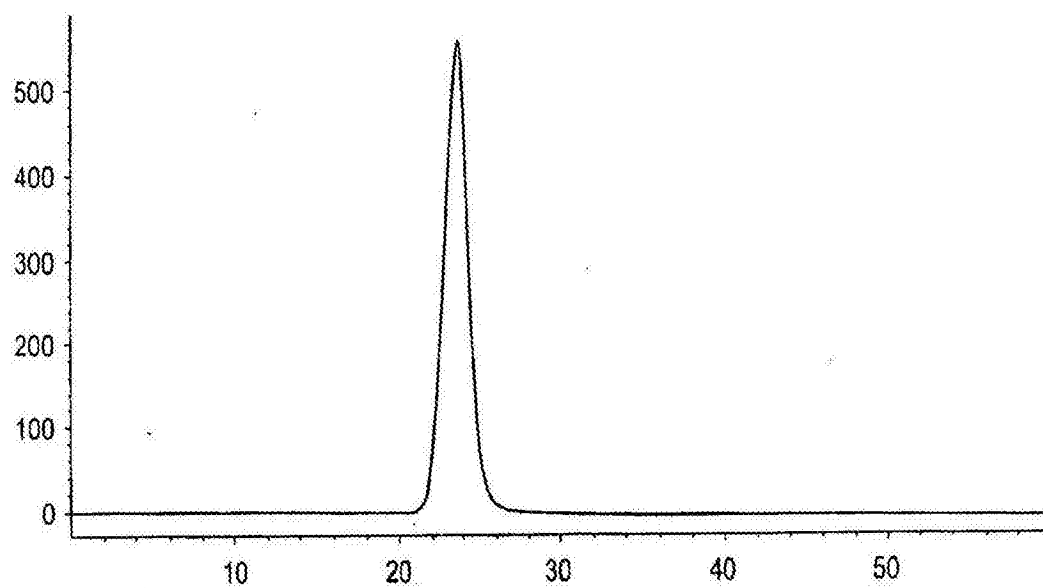


图1

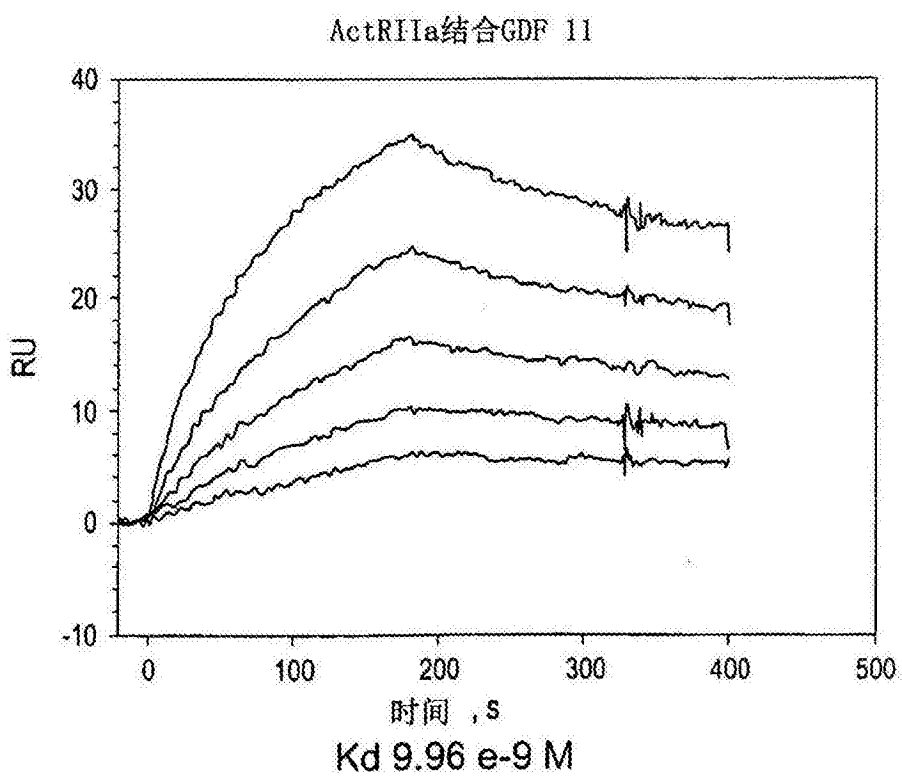
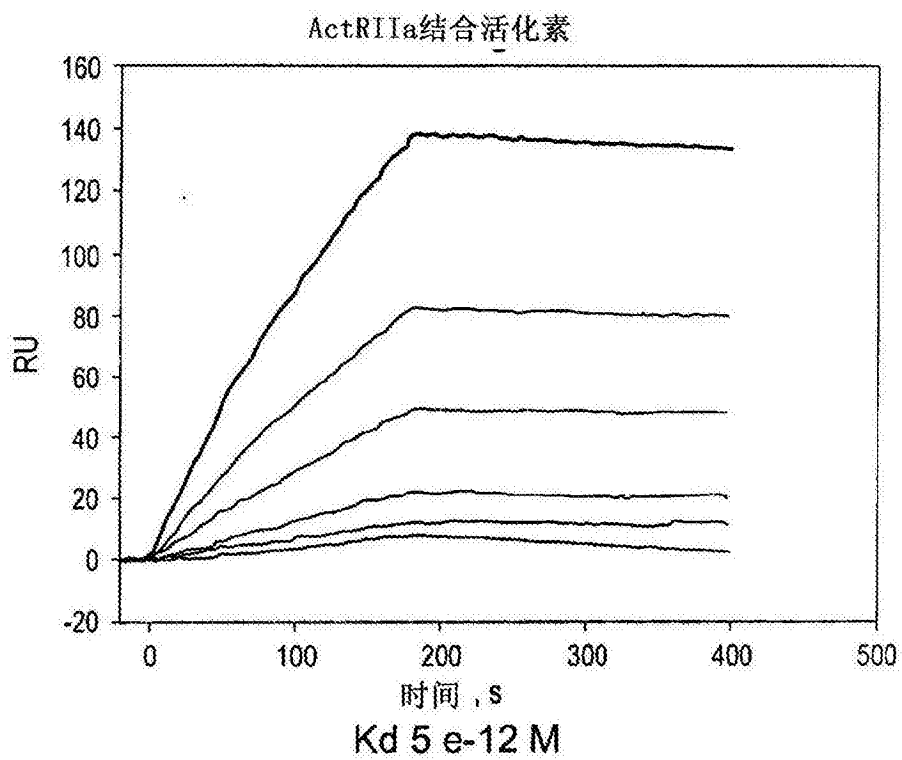


图2

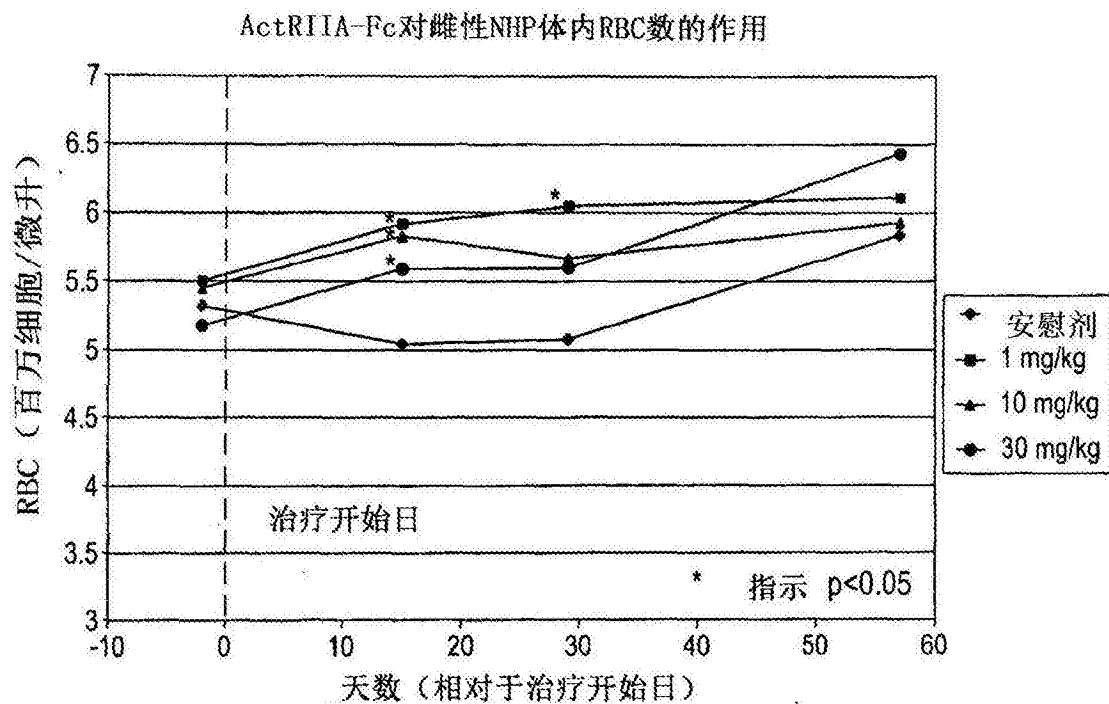


图3A

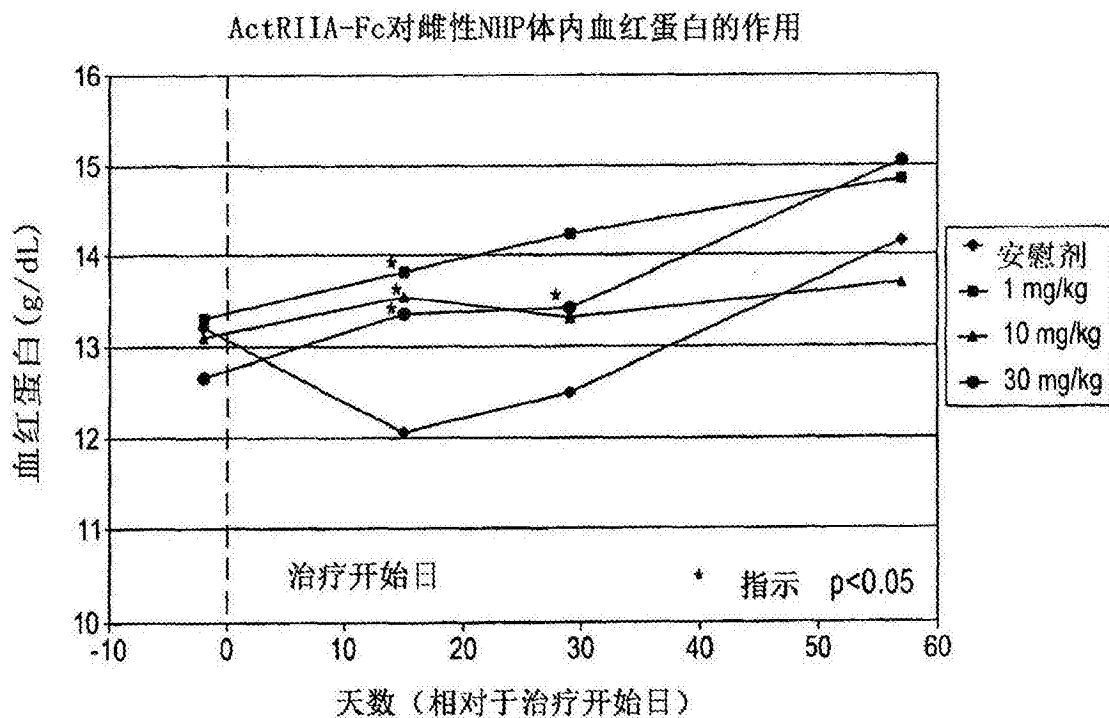


图3B

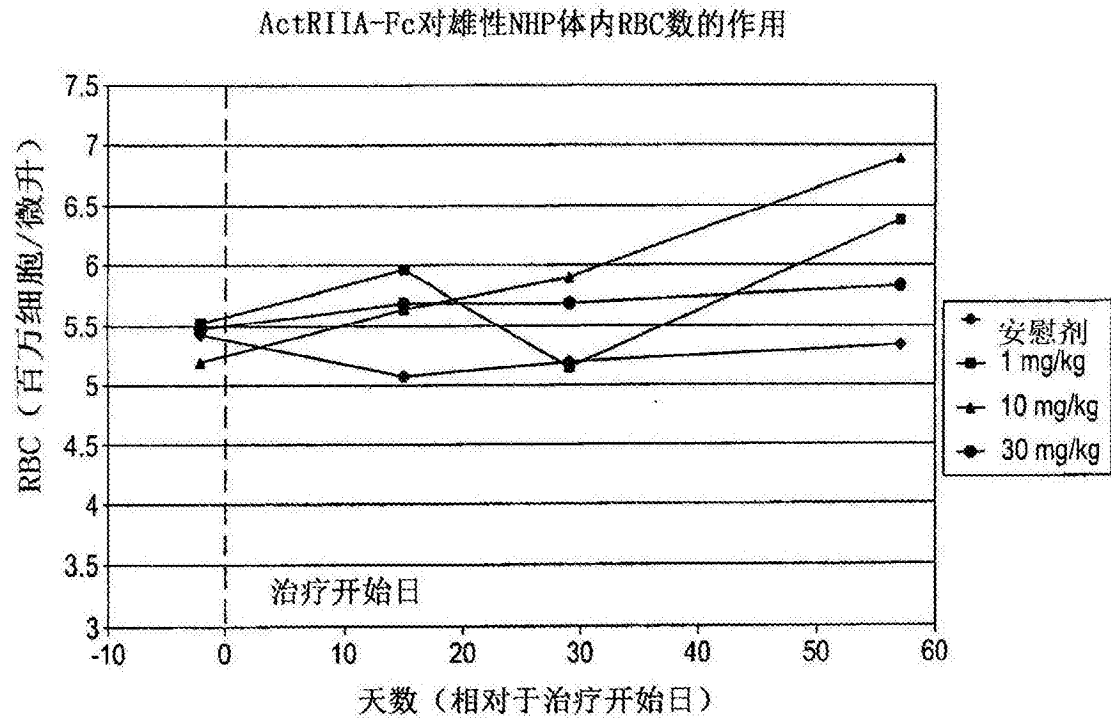


图4A

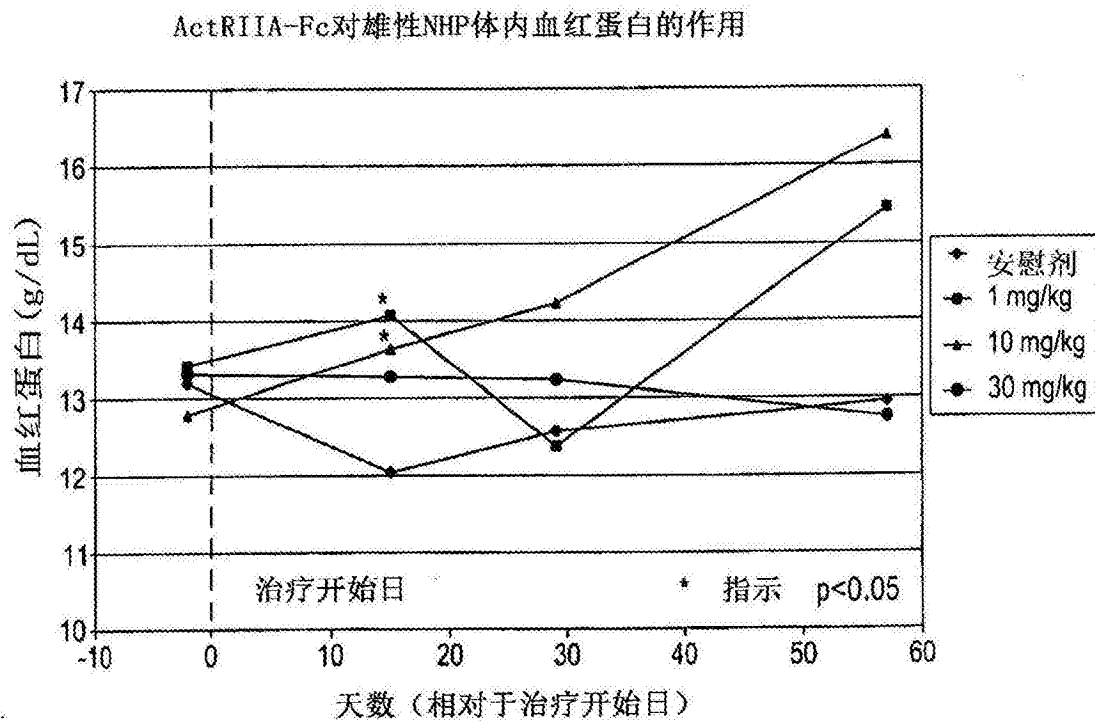


图4B

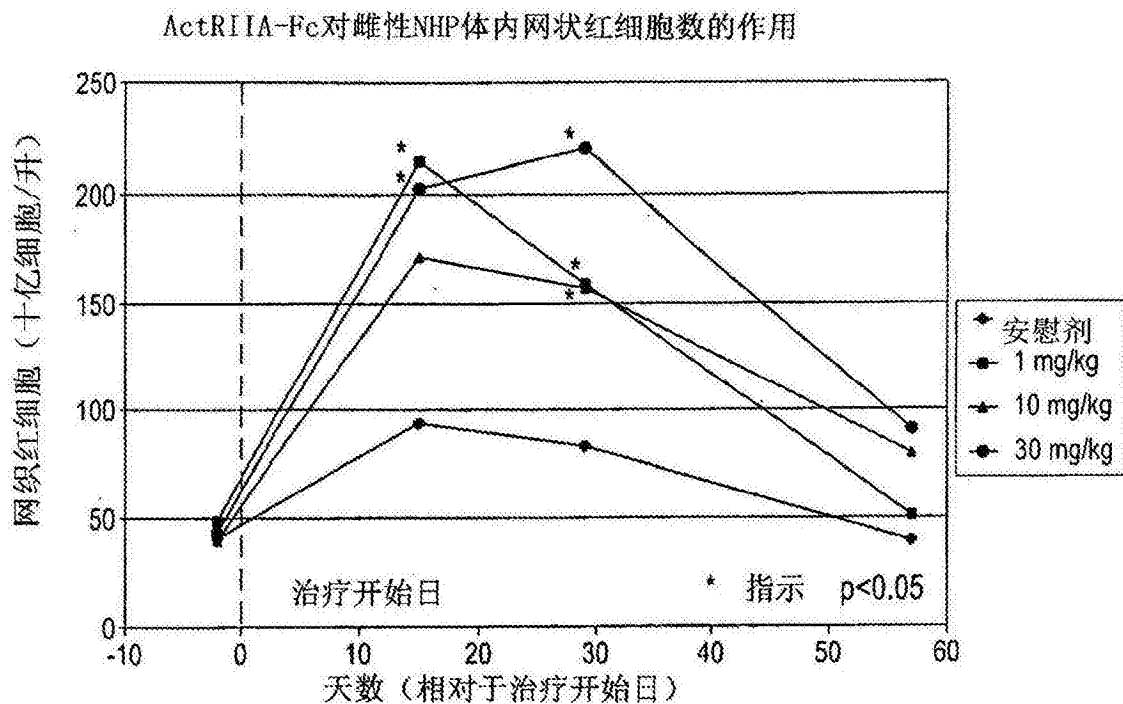


图5A

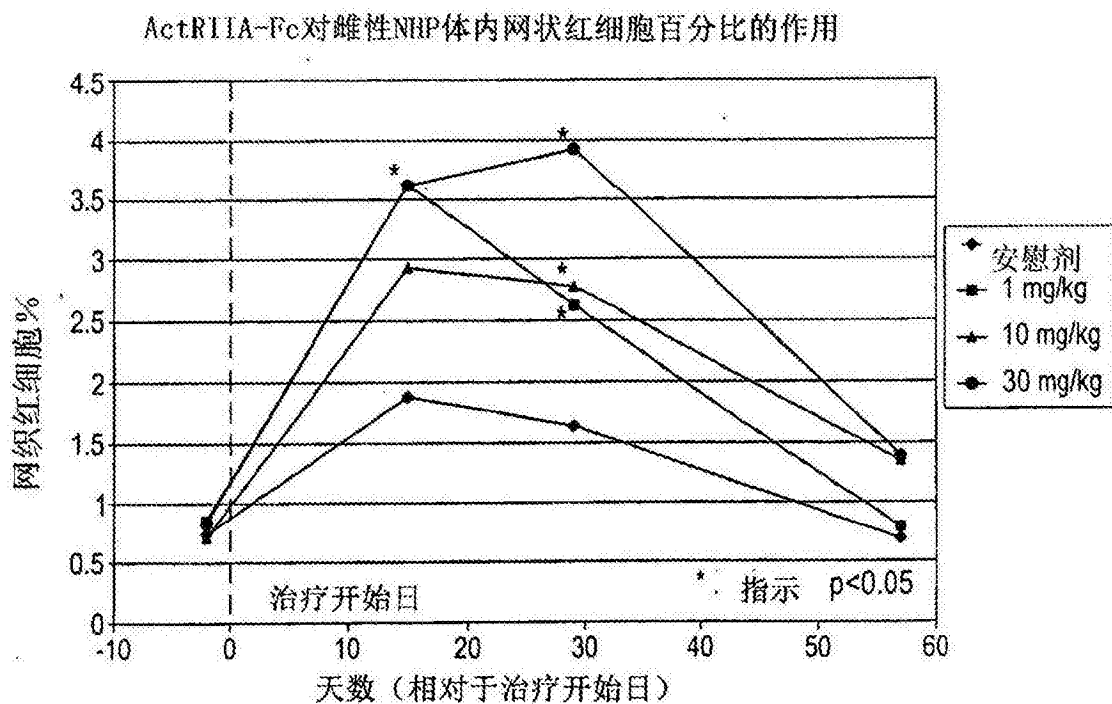


图5B

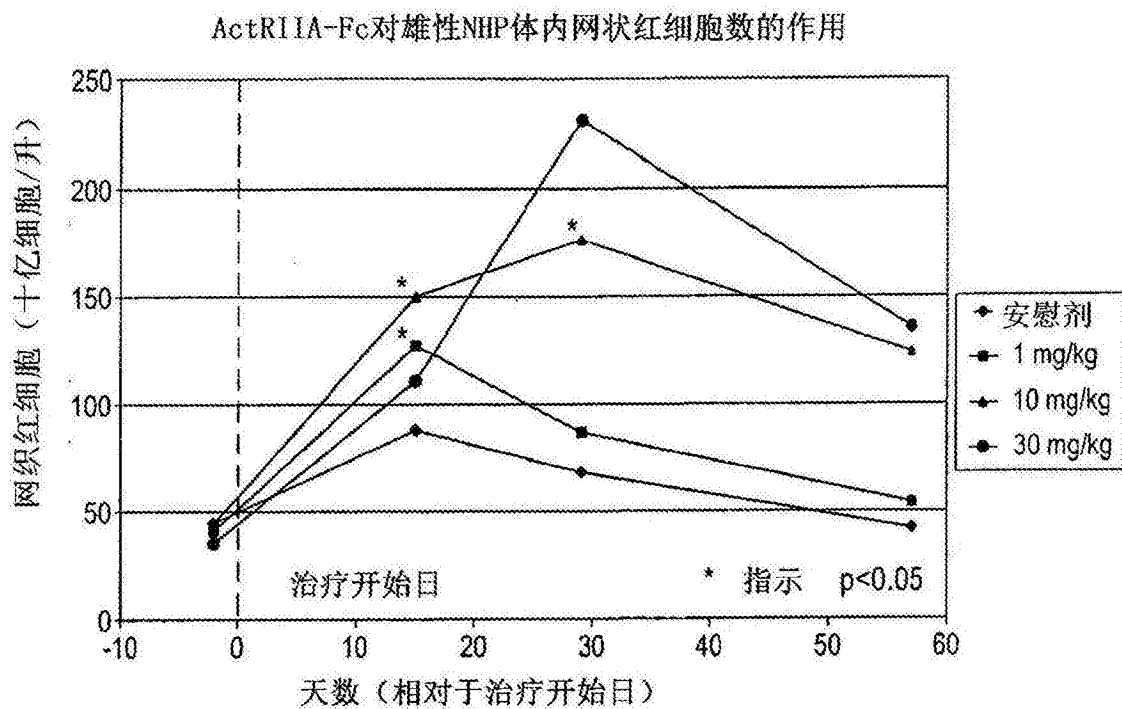


图6A

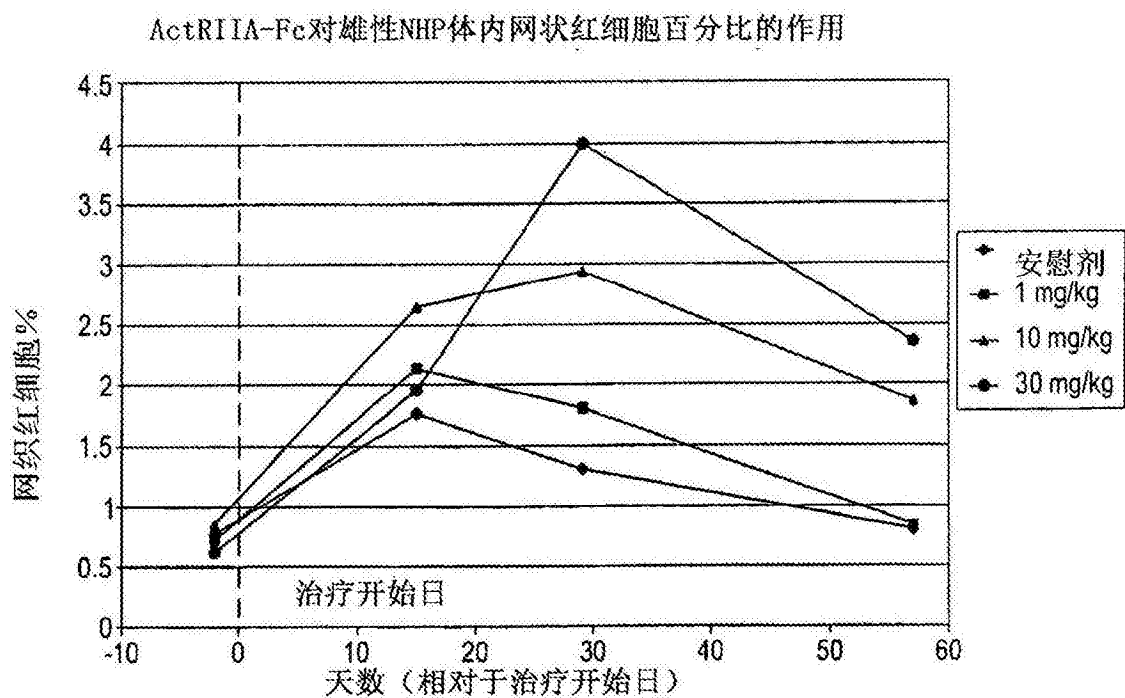


图6B

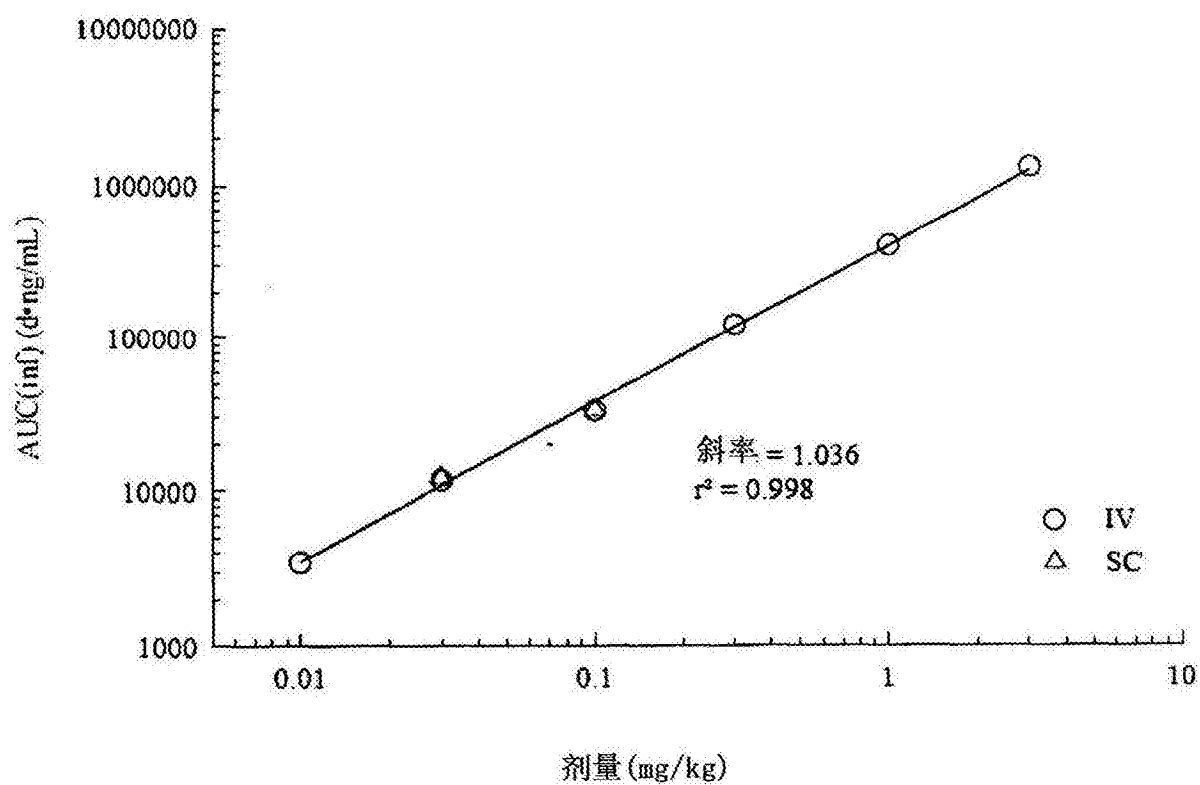


图7

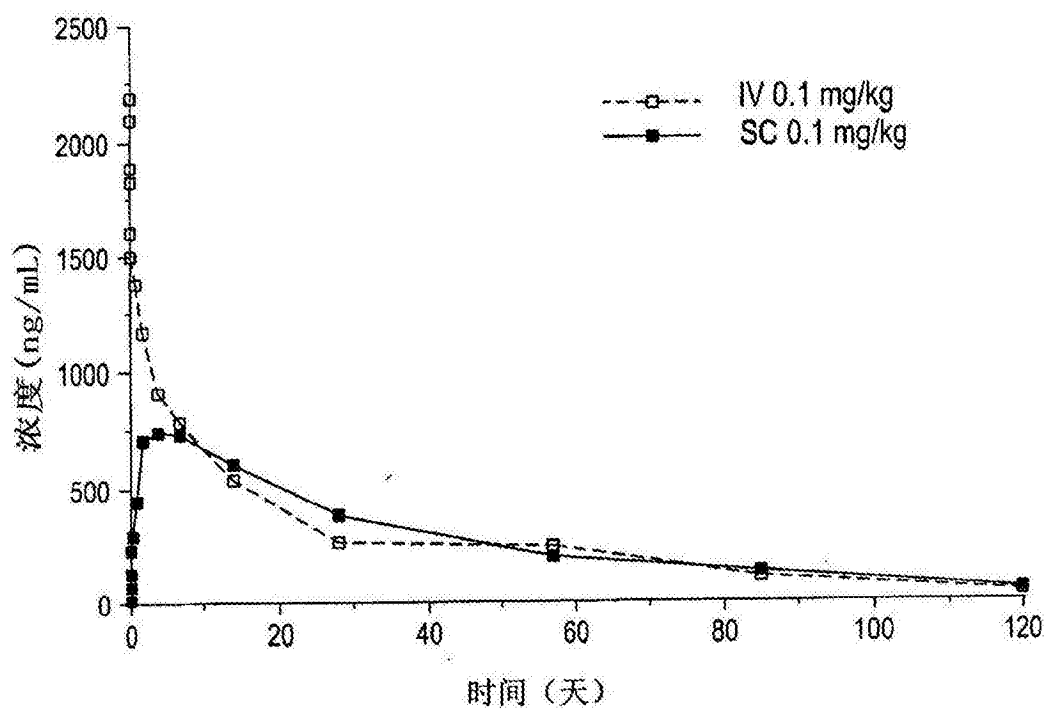


图8

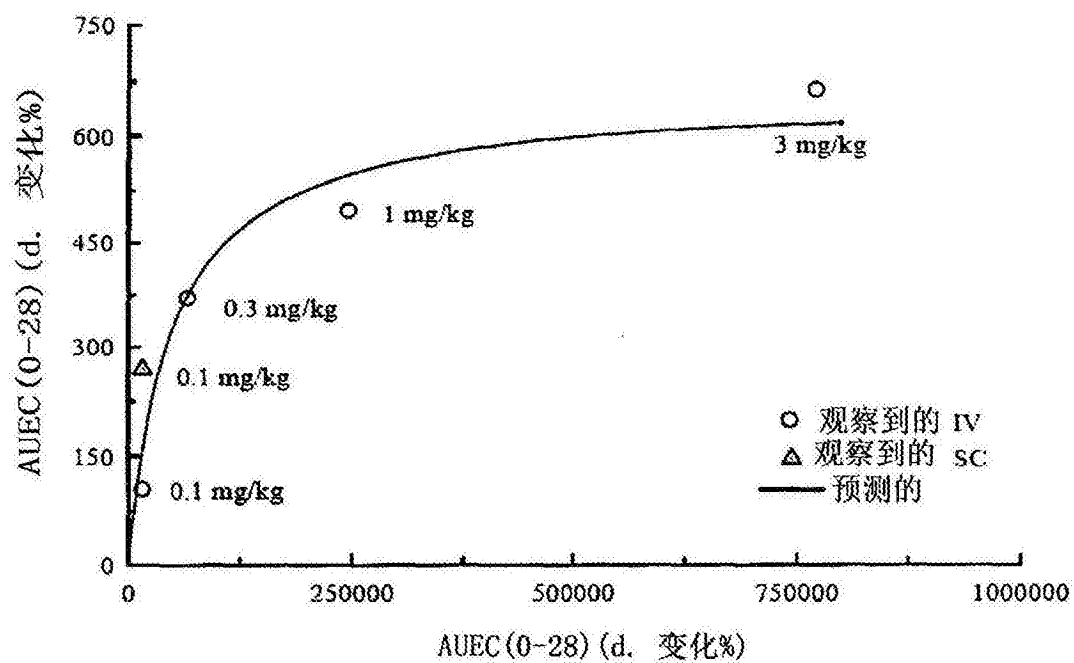


图9

IV中值变化以及从基线的变化范围-血细胞比容

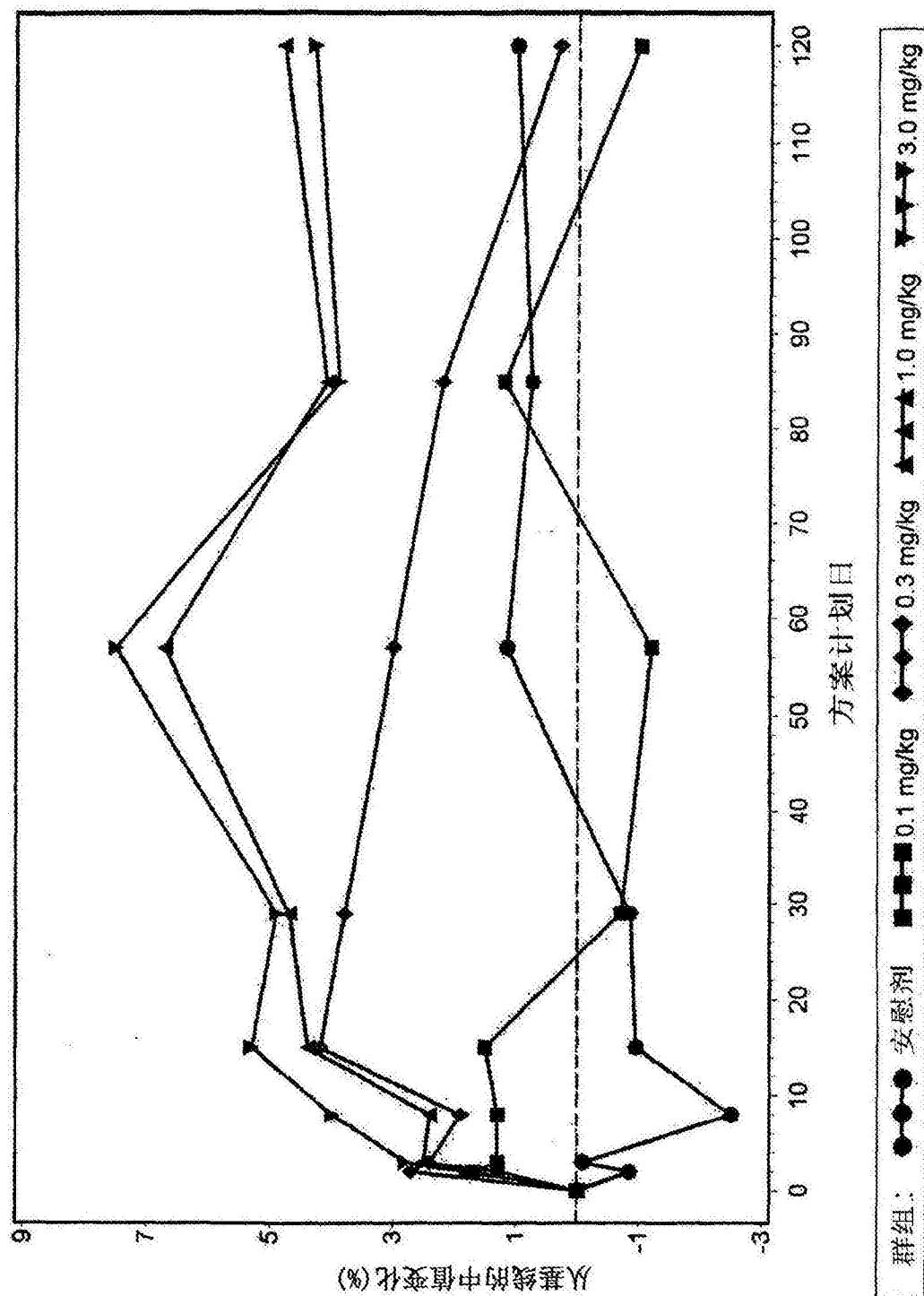


图10

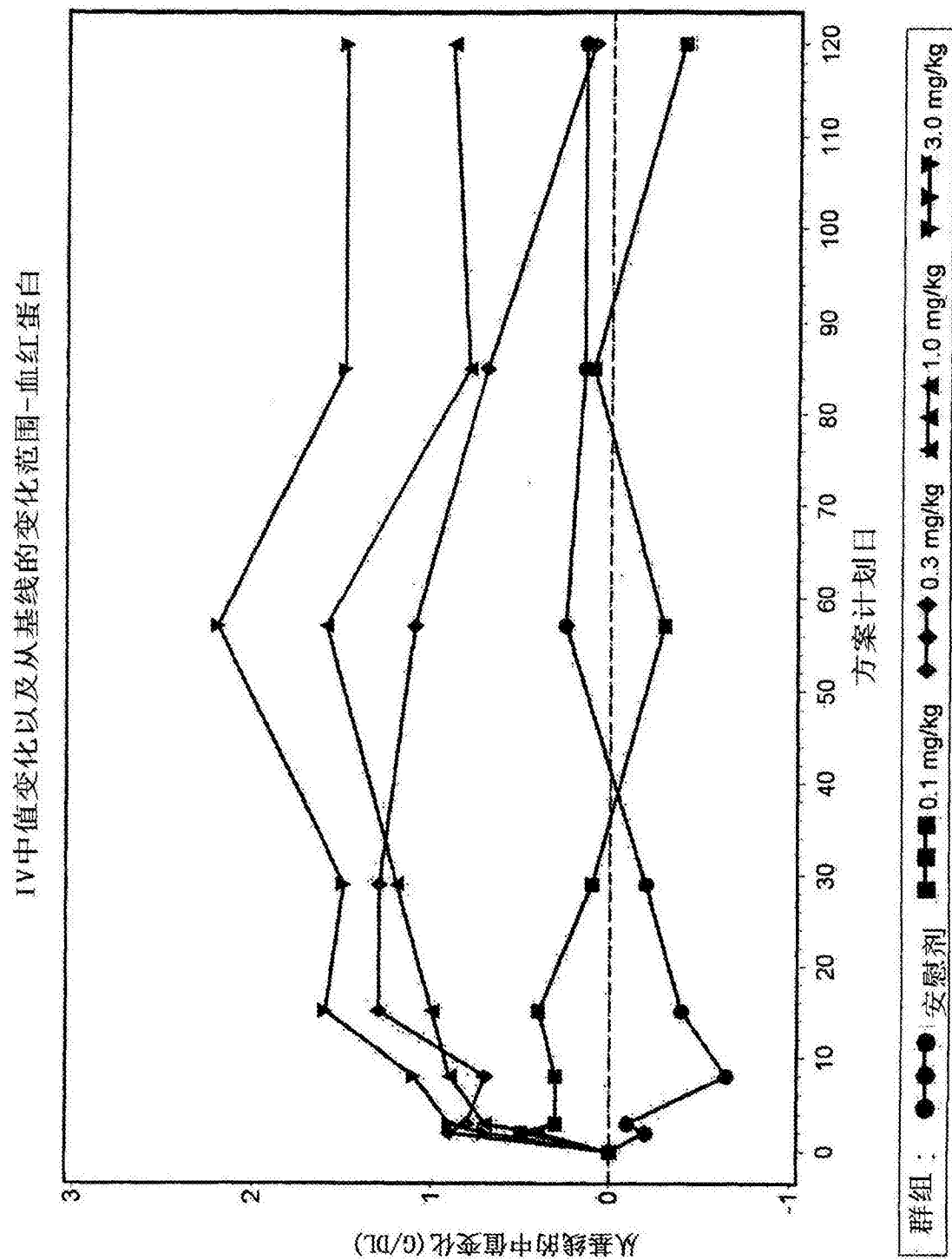


图11

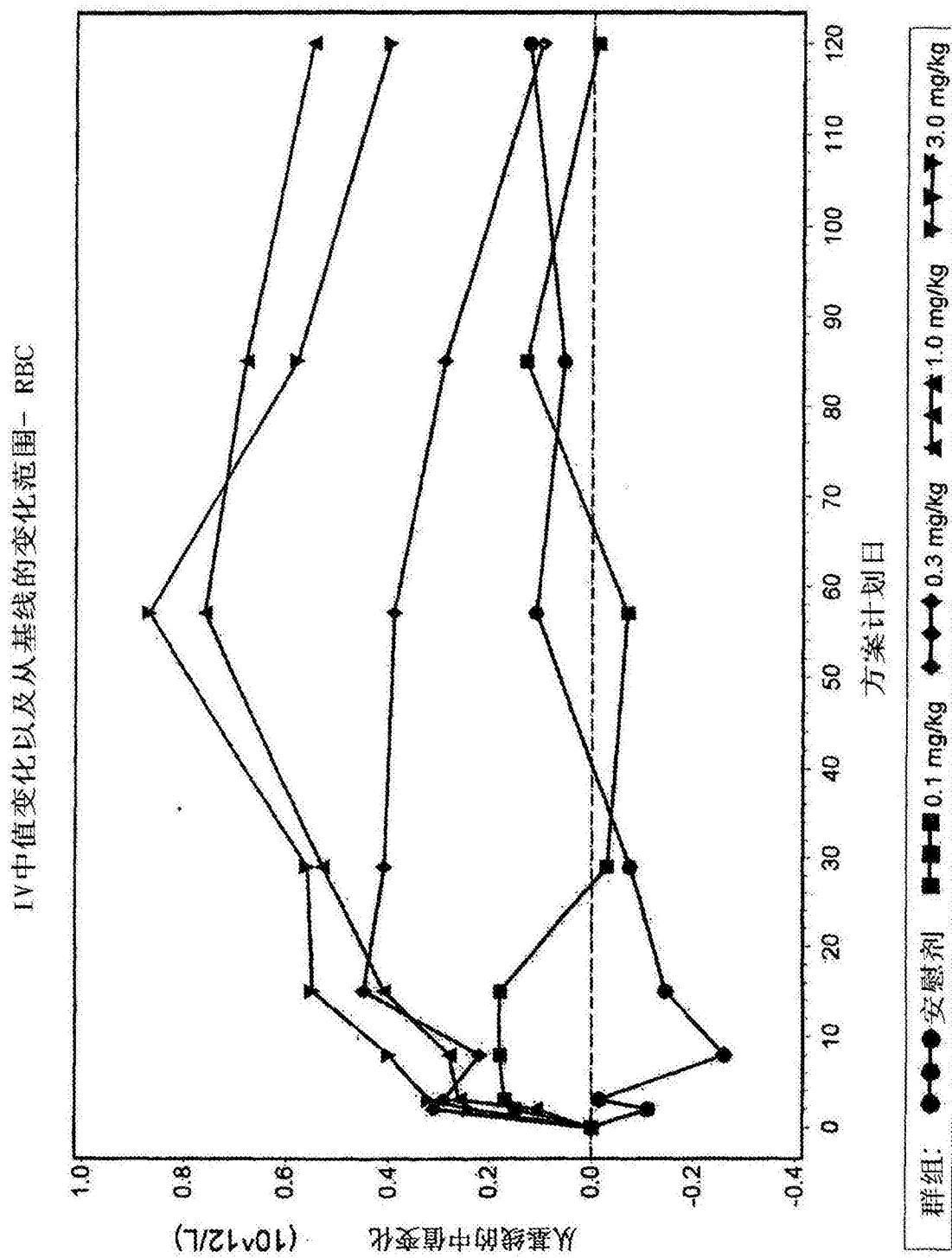


图12

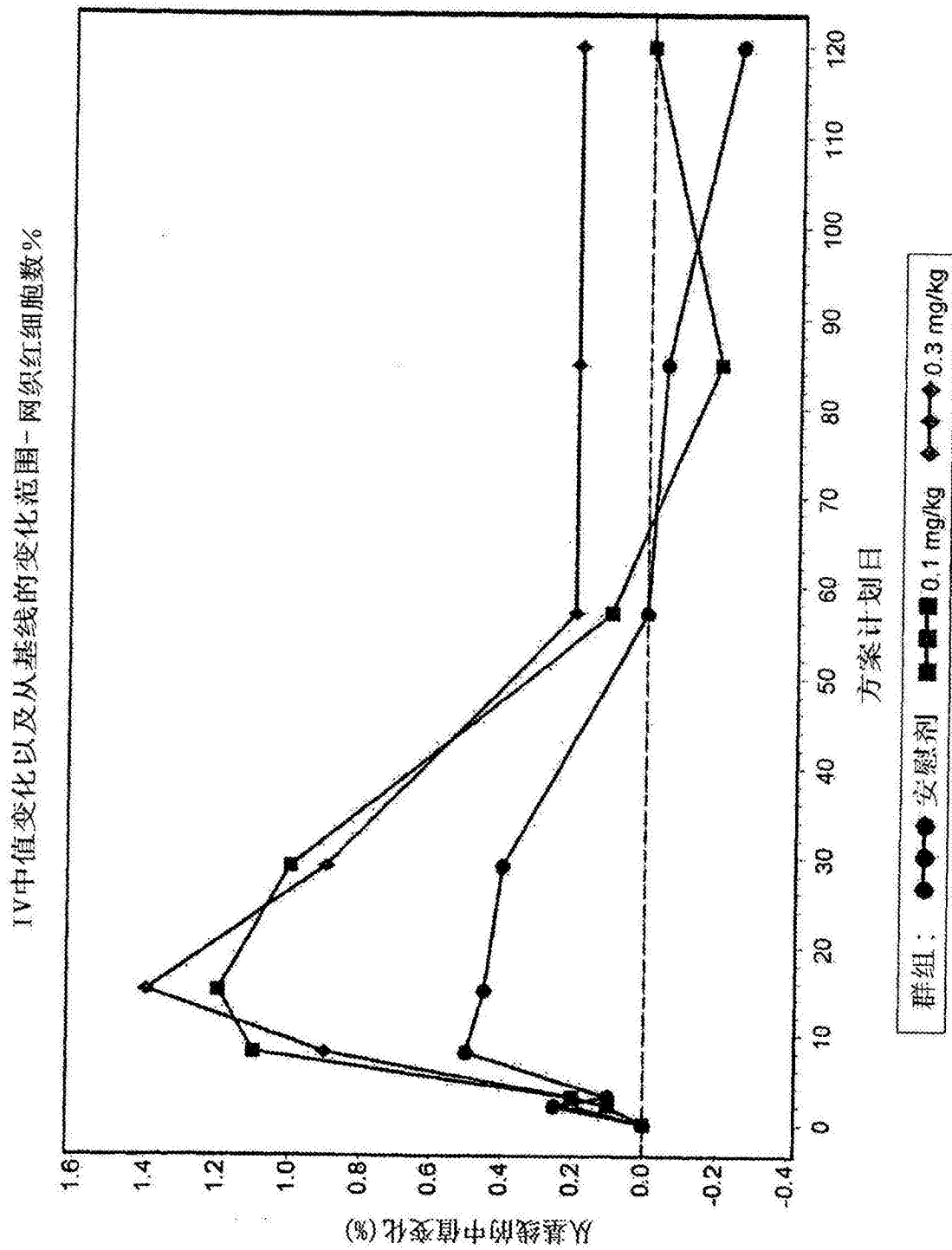


图13