

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97103890

※ 申請日期：97.2.1

※IPC 分類：

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

活化素-ActRIIa 拮抗劑及其治療或預防乳癌之用途

ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONISTS AND USES FOR TREATING  
OR PREVENTING BREAST CANCER

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

艾瑟勒朗法瑪公司 / ACCELERON PHARMA INC.

代表人：(中文/英文)

約翰 納夫 / KNOFF, JOHN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國麻州 02139 劍橋市艾蜜莉街 24 號

24 Emily Street, Cambridge, MA 02139, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.

## 三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 約翰 納夫 / KNOFF, JOHN

2. 傑斯伯 希勒 / SEEHRA, JASBIR

3. 瑞賓卓 庫瑪 / KUMAR, RAVINDRA

國 籍：(中文/英文)

1.~3. 美國 / U.S.A.

**四、聲明事項：**

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，  
其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.美國、2007.02.01、60/899,070

2.美國、2007.10.25、61/000,540

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於治療及預防人類之乳癌的組合物及方法。

### 【先前技術】

乳癌為西方國家之女性當中最常見類型之癌症，其每年影響美國 180,000 名以上之女性。該疾病發生於由支管系統組成之乳腺中。各乳腺或乳房含有 15 至 20 個稱為凸起部之區，且各凸起部含有一系列排入乳頭中之支管。沿各管排成直線之上皮細胞負責產生乳汁。據信侵襲性乳癌經一系列日益異常增生性病變而起源於終末導管/小葉單元之正常上皮。一旦腫瘤獲得轉移之能力，乳癌細胞即擴散至其他器官，使治療日益困難。乳癌轉移之最常見部位為肺、肝及骨。轉移至骨通常與重度疼痛、骨質流失及增加之骨折危險相關。治療乳癌中所使用之許多抗雌激素療法亦與骨質流失加速相關。

經診斷患有乳癌之患者典型地經歷手術及/或放射線療法以治療原發性腫瘤，繼之以佐劑療法以治療可能已擴散至遠緣部位之任何癌細胞。佐劑療法由細胞毒性化學療法及/或內分泌療法組成。儘管化學療法已有效治療各種類型之惡性疾病，但許多抗贅生性化合物誘發不合需要之副作用。另外，許多腫瘤未能回應化學療法及內分泌療法或變得對化學療法及內分泌療法具抗性。儘管輔佐療法已改良

乳癌患者當中之死亡率，但對於患有最常見組織病理學類型之侵襲性乳癌之患者而言 10 年存活率仍僅為 35-50% (Weigelt 等人 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602)。另外，歸因於不良預後標準，將由單獨局部治療治癒之許多女性多餘地接受輔佐療法。

因此，需要針對乳癌之更高效率及更有效之分子靶。比化學療法及內分泌療法毒性更小及/或更有效之替代療法將改良治療方案且增加存活。另外，可用作可能處於發展侵襲性或轉移性乳癌之危險中之患者的預防性治療之藥劑將在臨床上適用。由此，本案之揭示之一目的在於提供治療患者之乳癌或抑制或預防患者之乳癌進展的替代組合物及方法。

## 【發明內容】

### 發明概要

部分地，本案之揭示係關於活化素拮抗劑以及 ActRIIa 拮抗劑治療或預防乳癌或與乳癌相關之骨質流失的用途。尤其，本案之揭示提供使用充當活化素抑制劑之可溶形式 ActRIIa 治療或預防乳癌之方法。儘管可溶性 ActRIIa 可能經不同於活化素拮抗之機制影響癌細胞生長或存活，但所需治療劑仍可基於活化素拮抗或 ActRIIa 拮抗或二者來選擇。該等藥劑統稱作活化素-ActRIIa 拮抗劑。因此，在某些具體實例中，本案之揭示提供使用包括（例如）活化素結合性 ActRIIa 多肽、抗活化素抗體、抗 ActRIIa 抗體、



靶向活化素或靶向 ActRIIa 之小分子及適體 (aptamer) , 及減少活化素及 ActRIIa 表現之核酸的活化素-ActRIIa 拮抗劑治療或預防有需要之患者之乳癌的方法。如以引用的方式併入本文中之美國專利申請案第 11/603,485 號中所述, 活化素-ActRIIa 拮抗劑可用於促進骨生長且增加骨密度。如本文所述, 該等拮抗劑亦可用於治療或預防乳癌、乳癌轉移至骨及與乳癌相關之骨質流失。

在某些方面中, 本案之揭示提供使用包含與活化素結合之可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽之多肽治療或預防乳癌之方法。可將 ActRIIa 多肽調配成包含活化素結合性 ActRIIa 多肽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥製劑。活化素結合性 ActRIIa 多肽可以小於 1 微莫耳或小於 100、10 或 1 奈莫耳之  $K_D$  與活化素結合。視情況, 相對於結合 GDF11 及/或 GDF8, 活化素結合性 ActRIIa 多肽選擇性結合活化素, 且視情況以比對於 GDF11 及/或 GDF8 之  $K_D$  低至少 10 倍、20 倍或 50 倍之  $K_D$  與活化素結合。儘管不希望受特定作用機制束縛, 但仍預期此優於對 GDF11/GDF8 抑制的對活化素抑制之選擇性程度為對骨骼或腫瘤存活或生長有影響而對肌肉無始終可量測影響的原因。在許多具體實例中, 將選擇 ActRIIa 多肽以在達成對癌細胞之所需影響的劑量下引起肌肉增加小於 15%、小於 10% 或小於 5%。如由尺寸排阻層析法所評估, 組合物相對於其他多肽組份之純度可至少為 95%, 且視情況, 組合物之純度至少為 98%。在該製劑中使用之活化素結合性 ActRIIa 多肽可為本文所

揭示之彼等多肽中之任一者，諸如具有選自 SEQ ID NO: 2、3、7 或 12 之胺基酸序列的多肽，或具有與選自 SEQ ID NO: 2、3、7、12 或 13 之胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 一致之胺基酸序列的多肽。活化素結合性 ActRIIa 多肽可包括天然 ActRIIa 多肽之功能片段，諸如包含選自 SEQ ID NO: 1-3 之序列或缺乏 C 末端 10 至 15 個胺基酸（「尾巴」）之 SEQ ID NO: 2 之序列的至少 10 個、20 個、30 個、50 個或 90 個或更多個胺基酸之功能片段。

可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽相對於天然產生之 ActRIIa 多肽在胺基酸序列中（例如配位體結合域中）可包括一或多變異。變異 ActRIIa 多肽之實例提供於以引用的方式併入本文中之 WO 2006/012627，第 59-60 頁中。胺基酸序列的變異可（例如）改變當於哺乳動物、昆蟲或其他真核細胞中產生時多肽之糖基化或相對於天然產生之 ActRIIa 多肽改變多肽之蛋白質裂解。

活化素結合性 ActRIIa 多肽可為具有 ActRIIa 多肽（例如 ActRIIa 之配位體結合部分）作為一個域及一或多個提供所需特性之其他域的融合蛋白，該特性諸如改良之藥物動力學、較容易之純化、增強之對特定組織之靶向等。舉例而言，融合蛋白之域可增強活體內穩定性、活體內半衰期、吸收/投藥、組織定位或分布、蛋白質複合物形成、融合蛋白多聚化及/或純化中之一或多者。活化素結合 ActRIIa 融合蛋白可包括免疫球蛋白 Fc 域（野生型或突變體）或血清白蛋白或提供諸如改良之藥物動力學、改良之溶解性

或改良之穩定性之所需特定的其他多肽部分。在一較佳具體實例中，ActRIIa-Fc 融合體包含位於 Fc 域與細胞外 ActRIIa 域之間的相對未結構化連接子。此未結構化連接子可對應於在 ActRIIa 之胞外域之 C 末端處的約 15 個胺基酸未結構化區（「尾巴」），或其可為 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸之人工序列或長度介於 5 個與 15 個、20 個、30 個、50 個或更多個之胺基酸之間，相對無二級結構的人工序列，或二者之混合物。連接子可富含甘胺酸及脯胺酸殘基且可（例如）含有蘇胺酸/絲胺酸及甘胺酸之單一序列或蘇胺酸/絲胺酸及甘胺酸之重複序列（例如，TG<sub>4</sub> 或 SG<sub>4</sub> 單一體或重複體）。融合蛋白可包括純化序列，諸如抗原決定基標籤、FLAG 標籤、多組胺酸序列、及 GST 融合體。視情況，可溶性 ActRIIa 多肽包括一或多個選自以下各者之經修飾胺基酸殘基：糖基化胺基酸、PEG 化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、經結合生物素之胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸，及與有機衍生劑結合之胺基酸。醫藥製劑亦可包括一或多種其他化合物，諸如用於治療骨病症之化合物。較佳地，醫藥製劑實質上無熱原質。一般而言，ActRIIa 蛋白較佳於合適地介導 ActRIIa 蛋白之天然糖基化之哺乳動物細胞系中表現以減小患者之不利免疫反應的可能性。已成功使用人類細胞系及 CHO 細胞系，且預期其他常用哺乳動物表現系統將適用。另外，已在遺傳學上改變酵母及其他細胞類型以表現催化糖基化之哺乳動物酶，由此允許在於此等非哺乳動物細胞中表現

之蛋白質上產生嚴格控制之類哺乳動物糖基化。此等重組性細胞系亦可用於表現本文所述之蛋白質。

如本文所述，命名為 ActRIIa-Fc(一種具有介於 ActRIIa 部分與 Fc 部分之間的最小連接子之形式)之 ActRIIa 蛋白具有所需特性，包括相對於對 GDF8 及/或 GDF11 的對活化素之選擇性結合、高親和力配位體結合及在動物模型中長於兩週之血清半衰期。在某些具體實例中，本發明提供使用 ActRIIa-Fc 多肽及包含該等多肽及醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥製劑治療或預防乳癌之方法。

在某些方面中，本案之揭示提供使用編碼可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽之核酸治療或預防乳癌之方法。經分離聚核苷酸可包含可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽(諸如上述)之編碼序列。舉例而言，經分離核酸可包括編碼 ActRIIa 之胞外域(例如配位體結合域)之序列及會編碼 ActRIIa 之部分或全部跨膜域及/或細胞質域，但編碼位於跨膜域或細胞質域內或位於胞外域與跨膜域或細胞質域之間的終止密碼子之序列。舉例而言，經分離聚核苷酸可包含全長 ActRIIa 聚核苷酸序列(諸如 SEQ ID NO: 4 或 5)或部分截斷型式，該經分離聚核苷酸進一步包含轉錄終止密碼子，其處於 3'末端之前至少六百個核苷酸處或以其他方式定位使得聚核苷酸之轉譯產生視情況與全長 ActRIIa 之截斷部分融合之胞外域。較佳之核酸序列為 SEQ ID NO: 14。根據本文所述之方法適用之核酸可與表現啟動子以可操作方式連接，且本案之揭示提供經該等重組性聚核苷酸

轉型之細胞。較佳地，細胞為哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

本案之揭示亦提供製造可用於治療或預防乳癌之可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽之方法。該方法可包括在諸如 CHO 細胞之合適細胞中表現本文所揭示之核酸中之任一者（例如 SEQ ID NO: 4、5 或 14）。該方法可包含：a) 在適合於表現可溶性 ActRIIa 多肽之條件下培養細胞，其中該細胞經可溶性 ActRIIa 表現構築體轉型；及 b) 回收如此表現之可溶性 ActRIIa 多肽。可溶性 ActRIIa 多肽可以粗製、經部分純化或經高度純化之部分的形式回收。純化可由一系列純化步驟達成，該等純化步驟包括（例如）以任何次序進行之以下各者中之一者、兩者或三者或三者以上：蛋白質 A 層析、陰離子交換層析（例如 Q 瓊脂糖）、疏水性相互作用層析（例如 苯基瓊脂糖）、尺寸排阻層析及陽離子交換層析。

在某些方面中，本文所揭示之活化素-ActRIIa 拮抗劑，諸如可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽，可在治療、預防或抑制個體之乳癌的方法中使用，該方法包括（例如）延緩乳癌發作、抑制乳癌進程、減小腫瘤尺寸、預防腫瘤生長、延緩轉移發作或預防轉移（包括轉移至骨）之方法。在某些具體實例中，本案之揭示提供減少或抑制有需要之患者中乳癌細胞生長或存活的方法。方法可包含將有效量之活化素-ActRIIa 拮抗劑投予有需要之個體。在某些方面中，本案之揭示提供活化素-ActRIIa 拮抗劑製造用於治療

或預防如本文所述之乳癌之醫藥品的用途。本案之揭示亦係關於包含活化素-ActRIIa 拮抗劑及放射線療法、化學療法（例如細胞毒性劑）及/或內分泌療法之組合療法。拮抗劑可為 ActRIIa-Fc 融合蛋白，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含與 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列至少 90%一致之胺基酸序列。

在其他具體實例中，本發明係關於預防或延緩具有一或多個乳癌危險因子之患者乳癌發作的方法。在一些具體實例中，本發明係關於預防或延緩已經診斷患有原發性乳腺腫瘤或患有乳房增生性病變之患者轉移性疾病發作的方法。預防或延緩人類患者乳癌發作之方法可包含將有效量之選自由以下各者組成之群的多肽投予有需要之人類患者：a) 包含與 SEQ ID NO: 2 至少 90%一致之胺基酸序列的多肽；b) 包含與 SEQ ID NO: 3 至少 90%一致之胺基酸序列的多肽；及 c) 包含選自 SEQ ID NO: 2 之至少 50 個連續胺基酸的多肽。

本發明之其他具體實例係關於抑制患有乳癌之人類患者中活化素介導之信號轉導的方法。在某些具體實例中，該方法包含將有效量之活化素-ActRIIa 拮抗劑投予該人類患者。在其他具體實例中，該拮抗劑為選自由以下各者組成之群的多肽：a) 包含與 SEQ ID NO: 2 至少 90%一致之胺基酸序列的多肽；b) 包含與 SEQ ID NO: 3 至少 90%一致之胺基酸序列的多肽；及 c) 包含選自 SEQ ID NO: 2 之至少 50 個連續胺基酸的多肽。

在某些方面中，本案之揭示提供鑑別抑制癌細胞（例如乳癌細胞）生長或存活之藥劑的方法。該方法包含：a) 鑑別與活化素或 ActRIIa 多肽之配位體結合域結合之測試藥劑；及 b) 評估該藥劑對癌細胞增殖、存活或凋亡之影響。

## 【實施方式】

### 發明詳述

#### 1. 綜述

轉型生長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族含有多種共用共同序列元素及結構基元之生長因子。已知此等蛋白質對脊椎動物與無脊椎動物中之多種細胞類型產生生物作用。超家族之成員在胚胎發育期間在圖案形成及組織特化方面執行重要功能且可影響多種分化過程，包括脂肪生成、肌肉生成、軟骨生成、心臟生成、血細胞生成、神經生成及上皮細胞分化。該家族分成兩個一般分支：BMP/GDF 與 TGF- $\beta$ /活化素分支，其成員具有不同的、通常互補之作用。藉由操縱 TGF- $\beta$  家族之成員的活性，通常有可能引起有機體之顯著生理變化。舉例而言，皮埃蒙特牛 (Piedmontese cattle) 及比利時藍牛 (Belgian Blue cattle) 品種帶有在 GDF8 (亦稱為肌肉抑素) 基因中之功能喪失突變，該突變引起肌肉質量明顯增加。Grobet 等人, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4。此外，在人類中，GDF8 之非活性等位基因與肌肉質量增加相關，且據報導與異常強度相關。Schuelke 等人, N Engl

J Med 2004, 350:2682-8。

活化素為屬於 TGF- $\beta$  超家族之二聚多肽生長因子。存在三種主要活化素形式 (A、B 及 AB)，其為兩種密切相關之  $\beta$  子單元之同源二聚體/異源二聚體(分別為  $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$  及  $\beta_A\beta_B$ )。人類基因組亦編碼主要在肝中表現之活化素 C 及活化素 E，且亦已知含有  $\beta_C$  或  $\beta_E$  之異源二聚形式。在 TGF- $\beta$  超家族中，活化素為可刺激卵巢細胞及胎盤細胞中激素產生，支持神經元細胞存活，根據細胞類型而正面或負面影響細胞週期進程，且至少在兩棲動物胚胎中誘導中胚層分化之獨特及多功能因子 (DePaolo 等人, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson 等人, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963)。另外，已顯示活化素 B 涉及於小鼠中之乳腺上皮細胞分化的調節中 (Robinson 及 Hennighausen, 1997 Development 124: 2701-2708)。在若干組織中，活化素信號轉導受其相關異源二聚體抑制素 (inhibin) 拮抗。舉例而言，在卵泡刺激激素 (FSH) 自垂體釋放期間，活化素促進 FSH 分泌及合成，而抑制素阻止 FSH 分泌及合成。可調節活化素生物活性及/或與活化素結合之其他蛋白質包括卵泡抑素 (FS)、卵泡抑素相關蛋白 (FSRP) 及  $\alpha_2$ -巨球蛋白。

TGF- $\beta$  信號係由 I 型與 II 型絲胺酸/蘇胺酸激酶受體之異聚複合物介導，該等異聚複合物在配位體刺激後即使下游 Smad 蛋白磷酸化並活化 (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol.



Cell Biol. 1:169-178)。此等 I 型及 II 型受體為包含具有富含半胱氨酸區域之配位體結合胞外域、跨膜域及具有預測絲氨酸/蘇氨酸特異性之細胞質域的跨膜蛋白。I 型受體為信號轉導所必需；且 II 型受體為結合配位體及表現 I 型受體所需。I 型及 II 型活化素受體在配位體結合後形成穩定複合物，使得 I 型受體由 II 型受體磷酸化。

兩種相關 II 型受體 ActRIIa 與 ActRIIb 已被鑑別為活化素之 II 型受體(Mathews 及 Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano 等人, 1992, Cell 68: 97-108)。除活化素以外，ActRIIA 及 ActRIIB 可與若干其他 TGF- $\beta$  家族蛋白質（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 亦可充當活化素、尤其活化素 B 之受體。

如本文所述，顯示與其他 TGF- $\beta$  家族成員（諸如 GDF8 或 GDF11）對比在與活化素 A 結合方面顯示實質性優先性的可溶性 ActRIIa 多肽(sActRIIa)可用於治療或預防癌症、尤其乳癌。儘管不希望受任何特定機制束縛，但仍預期 sActRIIa 之作用主要由活化素拮抗劑作用所引起，假定此等研究中所使用之特定 sActRIIa 構築體顯示極強活化素結合（皮莫耳解離常數）。活化素-ActRIIa 拮抗劑包括（例

如) 活化素結合可溶性 ActRIIa 多肽、與活化素(尤其活化素 A 或 B 子單元, 亦稱作  $\beta$ A 或  $\beta$ B) 結合且破壞 ActRIIa 結合之抗體、與 ActRIIa 結合且破壞活化素結合之抗體、選擇用於活化素或 ActRIIa 結合之非抗體蛋白(對於該等蛋白質的實例及設計並選擇其之方法, 參見, 例如 WO/2002/088171、WO/2006/055689 及 WO/2002/032925), 及選擇用於活化素或 ActRIIa 結合(通常附著於 Fc 域)之隨機化肽。兩種具有活化素或 ActRIIa 結合活性之不同蛋白質(或其他部分), 尤其分別阻斷 I 型(例如可溶性 I 型活化素受體)及 II 型(例如可溶性 II 型活化素受體)結合位點之活化素結合劑, 可連接在一起以產生雙功能結合分子。亦可使用抑制活化素-ActRIIa 信號轉導軸之核酸適體、小分子及其他藥劑。多種蛋白質具有活化素-ActRIIa 拮抗劑活性, 包括抑制素(亦即, 抑制素  $\alpha$  子單元)(儘管抑制素並不普遍地在所有組織中拮抗活化素)、卵泡抑素(例如, 卵泡抑素-288 及卵泡抑素-315)、FSRP、活化素 C、 $\alpha$ (2)-巨球蛋白, 及 M108A(在位置 108 處甲硫胺酸變成丙胺酸)突變活化素 A。一般而言, 活化素之替代形式, 尤其在 I 型受體結合域中具有變異之彼等活化素, 可與 II 型受體結合且未能形成活性三元複合物, 由此充當拮抗劑。另外, 抑制活化素 A、B、C 或 E 或尤其抑制 ActRIIa 表現之核酸(諸如反義分子、siRNA 或核糖核酸酶)可用作活化素-ActRIIa 拮抗劑。待使用之活化素-ActRIIa 拮抗劑可顯示對比 TGF- $\beta$  家族之其他成員, 且尤其相對於 GDF8

及 GDF11 抑制活化素介導之信號轉導的選擇性。可溶性 ActRIIb 蛋白的確與活化素結合，然而，野生型蛋白質並不顯示對比 GDF8/11 與活化素結合之顯著選擇性。然而，該等 ActRIIb 多肽以及具有不同結合特性之 ActRIIb 變異形式（參見，例如 WO 2006/012627，第 55-59 頁，其以引用的方式併入本文中）可達成對癌細胞之所要影響。可藉由與第二活化素選擇性結合劑偶合而給與原予或變異 ActRIIb 以增加之對活化素之特異性。

在本發明之情形內且使用各術語之特定情形中，本說明書中所使用之術語一般具有其在此項技術中之普通含義。某些術語於下文或本說明書中之其他地方加以討論，以在描述本發明之組合物及方法以及如何製造及使用其方面向從業者提供額外導則。術語之任何使用之範疇或含義將自使用該術語之特定情形顯而易見。

「約」一般應意謂在給定量測之性質或精度下所量測之量的可接受誤差程度。典型地，例示性誤差程度處於給定值或值範圍之 20% 內、較佳 10% 內，且更佳 5% 內。

其他且尤其在生物系統中，術語「約」可意謂處於給定值之一個數量級內、較佳 5 倍以內且更佳 2 倍以內之值。除非另有規定，否則本文所給出之數量為近似值，其意謂當未明確規定時可推斷出術語「約」。

本發明之方法可包括將序列彼此比較之步驟，包括將野生型序列與一或多個突變體（序列變體）比較。該等比較典型地包含（例如）使用序列對準程式及/或此項技術中

所熟知之演算法（僅舉幾個例子，例如 BLAST、FASTA 及 MEGALIGN）將聚合物序列對準。熟習此項技術者可易於瞭解，在該等對準中，當突變含有殘基插入或缺失時，序列對準將在不含有所插入或所缺失之殘基的聚合物序列中引入「空位」（典型地由破折號或「A」表示）。

「同源」（所有其語法形式及拼法變化）係指具有「共同演化起源」之兩種蛋白質之間的關係，該等蛋白質包括來自相同有機體物種中之超家族之蛋白質以及來自不同有機體物種之同源蛋白質。該等蛋白質（及其編碼核酸）具有如由其序列相似性，根據一致性百分比抑或由特定殘基或基元及保守位置的存在所反映之序列同源性。

術語「序列相似性」（所有其語法形式）係指在可能共用或可能不共用共同演化起源之核酸序列或胺基酸序列之間的一致性或對應性之程度。

然而，在常見用法中及本發明應用中，術語「同源」當經諸如「高度」之副詞修飾時可指代序列相似性且可能或可能不涉及共同演化起源。

術語「乳癌」係指乳房之任何增生性病變或增生性異常，包括（例如）良性病變、前惡性及惡性病變、實體腫瘤及轉移性疾病（局部轉移，例如 III 期；與更廣泛轉移，例如 IV 期）。乳癌包括（但不限於）：腺癌、小葉（小細胞）癌、管內癌、髓性乳癌、黏液性乳癌、管狀乳癌、乳頭狀乳癌、佩吉特氏病（Paget's disease）及發炎性乳癌。乳癌亦係指起源於乳房之轉移性病變的於諸如肺、肝及骨

之其他器官中之疾病。乳癌亦涵蓋激素反應性癌症與激素非依賴性癌症。一般而言，激素非依賴性乳癌特徵在於無雌激素及/或孕酮受體或雌激素及/或孕酮受體之含量減少，且此等癌症典型地為用抗激素（尤其抗雌激素）療法治療難治癒。乳癌亦基於 Her2 表現來分類，其中 Her2<sup>+</sup>腫瘤具有比 Her2<sup>-</sup>腫瘤更差之預後。

## 2. ActRIIa 多肽

在某些方面中，本發明係關於使用 ActRIIa 多肽治療或預防乳癌之方法。如本文所用之術語「ActRIIa」係指來自任何物種之 IIa 型活化素受體（ActRIIa）蛋白質家族及藉由突變或其他修飾而衍生自該等 ActRIIa 蛋白之變體。在本文中提及 ActRIIa 應理解為提及目前所鑑別之形式中之任一者。ActRIIa 家族之成員一般為包含具有富含半胱氨酸區域之配位體結合胞外域、跨膜域及具有預測絲氨酸/蘇氨酸激酶活性之細胞質域的跨膜蛋白。

術語「ActRIIa 多肽」包括包含 ActRIIa 家族成員之任何天然產生多肽以及其保留有用活性之任何變體（包括突變體、片段、融合體及肽模擬物形式）之多肽。參見，例如 WO/2006/012627。舉例而言，ActRIIa 多肽包括衍生自序列與 ActRIIa 多肽之序列至少約 80%一致且視情況至少 85%、90%、95%、97%、99%或更高一致性的任何已知 ActRIIa 之序列的多肽。舉例而言，本發明之 ActRIIa 多肽可與 ActRIIa 蛋白及/或活化素結合且抑制其功能。ActRIIa 多肽可針對抑制活體內癌細胞增殖或存活之活性來選擇。

ActRIIa 多肽之實例包括人類 ActRIIa 前驅多肽 (SEQ ID NO: 1) 及可溶性人類 ActRIIa 多肽 (例如, SEQ ID NO: 2、3、7 及 12)。

人類 ActRIIa 前驅蛋白序列如下：

MGAAAKLAFVFLISSSGAILGRSETQECLFFNANW  
**EKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVK**  
**QGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEK**  
**FSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLSLVPLMLIAGIV**  
**ICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLL**  
**EVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYE**  
**VYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLS**  
**SDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHK**  
**PAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGLALKFEAGKSAGDT**  
**HGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLW**  
**ELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQE<sup>~</sup>VVHK**  
**KKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGC**  
**VGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL**  
 (SEQ ID NO: 1)

信號肽加單下劃線；胞外域為粗體且潛在 N-連接糖基化位點加雙下劃線。

人類 ActRIIa 可溶性 (細胞外) 經加工之多肽序列如下：

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKR**  
**RHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**

EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP( SEQ ID NO: 2)

應注意，N 末端序列開頭「ILG...」已經實驗測定且不同於通常於文獻中提出之「AIL...」N 末端序列。胞外域之 C 末端「尾巴」加下劃線。「尾巴」缺失之序列 ( $\Delta 15$  序列) 如下：

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKR  
RHC FATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP  
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM ( SEQ ID NO: 3)

編碼人類 ActRIIa 前驅蛋白之核酸序列如下 ( Genbank 條目 NM\_001616 之核苷酸 164-1705 ) :

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTT  
CTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAG  
AACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAA  
AAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATG  
GTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGA  
AGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTT  
GTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATT  
GTGTAGAAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTT  
GCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTT  
TCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCCTCAAATCCAGT  
TACACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCC  
TTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTG  
CATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTC

200846020

CTGTACTTGTTCCA ACTCAAGACCCAGGACCACCCCCAC  
CTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGA  
AGTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGC  
CCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCC  
AATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAG  
TCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTAC  
AGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTTGATG  
TGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTT  
CACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAA  
TGA ACTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATT  
GGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGG  
CCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAA  
AAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGC  
TGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTC  
TGCAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTA  
CATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACTTCCA  
AAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGG  
ATTAGTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCA  
GATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAG  
GAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAA  
GTTGTTGTGCATAAAAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGAT  
TATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAA  
ACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGG  
TTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATG



CAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTA  
ACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCC  
AAAGAATCTAGTCTATGA ( SEQ ID NO: 4)

編碼人類 ActRIIa 可溶性 (細胞外) 多肽之核酸序列  
如下：

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTC  
TTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAA  
GGTGTGAAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGG  
CATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTG  
AAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACT  
GCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAAAGACAGCC  
CTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAA  
TGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACA  
GCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC( SEQ ID  
NO: 5)

在一特定具體實例中，本發明係關於使用可溶性 ActRIIa 多肽治療或預防乳癌之方法。如本文所述之術語「可溶性 ActRIIa 多肽」一般係指包含 ActRIIa 蛋白之胞外域之多肽。如本文所用之術語「可溶性 ActRIIa 多肽」包括 ActRIIa 蛋白之任何天然產生胞外域以及其任何變體 (包括突變體、片段及肽模擬物形式)。活化素結合性 ActRIIa 多肽為保持與包括 (例如) 活化素 AA、AB、BB 或包括 C 或 E 子單元之形式的活化素結合之能力者。視情況，活化素結合性 ActRIIa 多肽將以 1 nM 或更小之解離常

數與活化素 AA 結合。ActRIIa 蛋白之胞外域與活化素結合且一般為可溶的，且由此可稱為可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽。可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽之實例包括 SEQ ID NO: 2、3、7、12 及 13 所說明之可溶性多肽。SEQ ID NO: 7 係稱為 ActRIIa-hFc，且在實施例中進一步描述。可溶性活化素結合性 ActRIIa 多肽之其他實例包含除 ActRIIa 蛋白之胞外域以外之信號序列，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劑（TPA）前導子（SEQ ID NO: 9）或原生 ActRIIa 前導子（SEQ ID NO: 10）。SEQ ID NO: 13 所說明之 ActRIIa-hFc 多肽使用 TPA 前導子。

ActRIIa 多肽之功能活性片段可藉由篩選自編碼 ActRIIa 多肽之核酸的相應片段重組產生之多肽而獲得。另外，片段可使用此項技術中已知之技術（諸如習知 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化學）來化學合成。可（以重組方式或藉由化學合成）產生片段且對其測試以鑑別可充當 ActRIIa 蛋白或由活化素介導之信號轉導之拮抗劑（抑制劑）的彼等肽基片段。

ActRIIa 多肽之功能活性變體可藉由篩選自編碼 ActRIIa 多肽之相應突變核酸重組產生之經修飾多肽的文庫而獲得。可產生變體且對其測試以鑑別可充當 ActRIIa 蛋白或由活化素介導之信號轉導之拮抗劑（抑制劑）的彼等變體。在某些具體實例中，ActRIIa 多肽之功能變體包含與選自 SEQ ID NO: 2 或 3 之胺基酸序列至少 75% 一致的

胺基酸序列。在某些狀況下，功能變體具有與選自 SEQ ID NO: 2 或 3 之胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 一致的胺基酸序列。

功能變體可藉由出於增強治療功效或穩定性（例如活體外存放期及對活體內蛋白水解降解之抗性）之目的來修飾 ActRIIa 多肽之結構而產生。該等經修飾之 ActRIIa 多肽當經選擇以保留活化素結合性時被視為天然產生之 ActRIIa 多肽之功能等效物。經修飾之 ActRIIa 多肽亦可（例如）藉由胺基酸取代、缺失或添加而產生。舉例而言，合理地預期白胺酸經異白胺酸或纈胺酸、天冬胺酸酯經麩胺酸酯、蘇胺酸經絲胺酸的經分離置換或胺基酸經結構相關胺基酸的類似置換（例如保守突變）不會對所得分子之生物活性產生主要影響。保守置換為在胺基酸家族內發生之與其側鏈相關之彼等置換。ActRIIa 多肽之胺基酸序列的變化是否產生功能同源物可易於藉由評估變體 ActRIIa 多肽以類似於野生型 ActRIIa 多肽之方式在細胞中產生反應的能力來確定。

在某些具體實例中，本發明涵蓋使用具有改變多肽之糖基化之特定突變的 ActRIIa 多肽治療或預防乳癌之方法。該等突變可經選擇以引入或消除一或多個糖基化位點，諸如 O-連接或 N-連接糖基化位點。天冬醯胺酸連接糖基化識別位點一般包含由適當細胞糖基化酶特異性識別之三肽序列天冬醯胺酸-X-蘇胺酸或天冬醯胺酸-X-絲胺酸（其中「X」為任何胺基酸）。變異亦可藉由將一或多個

絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至野生型 ActRIIa 多肽之序列中或使野生型 ActRIIa 多肽之序列經一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代而得（對於 O-連接糖基化位點而言）。在糖基化識別位點之第一或第三胺基酸位置中之一或兩者處的多種胺基酸取代或缺失（及/或在第二位置處之胺基酸缺失）在經修飾之三肽序列處產生非糖基化。增加 ActRIIa 多肽上之碳水化合物部分之數目的另一方式為藉由使糖苷與 ActRIIa 多肽化學或酶促偶合。視所使用之偶合模式而定，可使糖與以下各者連接：（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游離硫氫基；（d）游離羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之彼等游離羥基；（e）芳族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之彼等芳族殘基；或（f）麩醯胺酸之醯胺基。移除存在於 ActRIIa 多肽上之一或多個碳水化合物部分可以化學方式及/或以酶促方式實現。化學脫糖基化可涉及（例如）將 ActRIIa 多肽暴露於化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物。此處理使得除連接糖（N-乙醯基葡糖胺或 N-乙醯基半乳糖胺）以外之多數或所有糖裂解，同時留下完整胺基酸序列。如由 Thotakura 等人(1987) Meth. Enzymol. 138:350 所述，ActRIIa 多肽上之碳水化合物部分的酶促裂解可藉由使用多種內切糖苷酶及外切糖苷酶來達成。當哺乳動物、酵母、昆蟲及植物細胞皆可引入可受 ActRIIa 多肽之胺基酸序列影響之不同糖基化模式時，該肽之序列適當時可視所使用之表現系統之類型而加以調整。儘管預期其他

哺乳動物表現細胞系同樣適用，但一般而言，於人類中使用之 ActRIIa 蛋白可在提供適當糖基化之哺乳動物細胞系（諸如 HEK293 或 CHO 細胞系）中表現。

本案之揭示進一步涵蓋產生 ActRIIa 多肽之突變體、尤其組合突變體組以及截斷突變體之方法；組合突變體組尤其適用於鑑別功能變體序列。篩選該等組合文庫之目的可在於產生（例如）與活化素或其他配位體結合之 ActRIIa 多肽變體。多種篩選檢定提供於下文中，且該等檢定可用於評估變體。舉例而言，ActRIIa 多肽變體可針對與 ActRIIa 配位體結合、防止 ActRIIa 配位體與 ActRIIa 多肽結合或干擾由 ActRIIa 配位體引起之信號轉導的能力來篩選。

ActRIIa 多肽或其變體之活性亦可在基於細胞之檢定或活體內檢定中測試。舉例而言，可評估 ActRIIa 多肽變體對癌細胞增殖或存活的影响。癌細胞可指代在活個體中構成實體腫瘤之細胞或指代已起源於腫瘤且已擴散至活個體內其他部位之細胞（亦即，轉移性細胞）。另外，癌細胞可指代獲自或衍生自腫瘤或癌生長且於試管內培養之細胞。癌細胞亦涵蓋可於試管內培養或在（例如）動物異種移植研究中使用之細胞系。癌細胞亦指代經轉移後細胞分裂而衍生自轉移性細胞之細胞。該等細胞可為激素反應性的（例如雌激素受體陽性）或激素非依賴性的（例如雌激素受體陰性）。可在一或多種重組性 ActRIIa 配位體蛋白（例如活化素）存在下評估癌細胞增殖或存活，且可轉染細胞以產生 ActRIIa 多肽及/或其變體，及視情況之 ActRIIa

配位體。同樣地，可將 ActRIIa 多肽投予小鼠或其他動物，且可評估一或多種量測，諸如相對於對照之腫瘤尺寸或細胞增殖或凋亡之速率。

可產生相對於天然產生之 ActRIIa 多肽具有選擇性或一般增加之效能的組合衍生變體。同樣地，突變可產生具有顯著不同於相應野生型 ActRIIa 多肽之細胞內半衰期的變體。舉例而言，可使變異蛋白質對蛋白水解降解或引起原生 ActRIIa 多肽破壞或以其他方式失活之其他細胞過程更加穩定或較不穩定。該等變體及其編碼基因可用於藉由調節 ActRIIa 多肽之半衰期而改變 ActRIIa 多肽含量。舉例而言，短半衰期可引起更短暫之生物作用且當為誘導性表現系統之一部分時可允許更嚴格控制細胞內重組性 ActRIIa 多肽含量。在 Fc 融合蛋白中，可在連接子（若有）及/或 Fc 部分中進行突變以改變蛋白質之半衰期。

組合文庫可經由編碼各自包括至少一部分潛在 ActRIIa 多肽序列之多肽文庫的基因簡并文庫來產生。舉例而言，可使合成寡核苷酸之混合物酶促接合至基因序列中使得潛在 ActRIIa 多肽核苷酸序列之簡并組可表現為個別多肽或者可表現為一組較大融合蛋白（例如，對於噬菌體呈現）。

存在許多可用於自簡并寡核苷酸序列產生潛在同源物之文庫的方式。簡并基因序列的化學合成可在自動 DNA 合成器中進行，且可接著使合成基因接合至適當表現載體中。簡并寡核苷酸的合成在此項技術中已為熟知（參見，例如 Narang, SA (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) 。該等技術已在其他蛋白質之定向演化中使用 ( 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, 其他形式之突變可用於產生組合文庫。舉例而言, 可藉由使用以下方式進行篩選而自文庫產生並分離 ActRIIa 多肽變體: 例如, 丙胺酸掃描突變及類似方式 ( 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) ; 連接子掃描突變 ( 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) ; 飽和突變 ( Meyers 等人, (1986) Science 232:613) ; PCR 突變 ( Leung 等人, (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) ;

或隨機突變(包括化學突變等)(Miller 等人, (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 及 Greener 等人, (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34)。連接子掃描突變, 尤其在組合設定中, 為鑑別截斷(生物活性)形式之 ActRIIa 多肽的具吸引力之方法。

廣泛技術在此項技術中已知用於篩選藉由點突變及截斷所得之組合文庫之基因產物且就此而言用於篩選 cDNA 文庫中具有某種特性之基因產物。該等技術一般將適於快速篩選由 ActRIIa 多肽之組合突變所產生之基因文庫。最廣泛使用之篩選大基因文庫之技術典型地包含將基因文庫選殖至可複製表現載體中, 用所得載體文庫轉型適當細胞, 且在所要活性之偵測有利於編碼基因(偵測其產物)之載體相對容易地分離之條件下表現組合基因。較佳之檢定包括活化素結合檢定及活化素介導之細胞信號轉導檢定。

在某些具體實例中, 根據本文所述之方法適用之 ActRIIa 多肽除天然存在於 ActRIIa 多肽中之任何者以外可進一步包含轉譯後修飾。該等修飾包括(但不限於): 乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化及醯化。由此, 經修飾之 ActRIIa 多肽可含有非胺基酸元素, 諸如聚乙二醇、脂質、多醣或單醣, 及磷酸酯。該等非胺基酸元素對 ActRIIa 多肽之功能性的影響可如本文對於其他 ActRIIa 多肽變體所述來測試。當藉由使初生形式之 ActRIIa 多肽裂解而在細胞中產生 ActRIIa 多肽時, 轉譯後加工對於蛋白質之正



確摺疊及/或功能而言亦為重要的。不同細胞（諸如 CHO、HeLa、MDCK、WI38、NIH-3T3 或 HEK293）具有該等轉譯後活性之特定細胞機構及特徵機制且可經選擇以確保 ActRIIa 多肽之正確修飾及加工。

在某些方面中，ActRIIa 多肽之功能變體或經修飾形式包括具有至少一部分 ActRIIa 多肽及一或多個融合域之融合蛋白。該等融合域之熟知實例包括（但不限於）：多組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽 S 轉移酶（GST）、硫氧還蛋白（thioredoxin）、蛋白質 A、蛋白質 G、免疫球蛋白重鏈恆定區（Fc）、麥芽糖結合蛋白（MBP）或人血清白蛋白。融合域可經選擇以賦予所要特性。舉例而言，一些融合域尤其適用於藉由親和力層析分離融合蛋白。出於親和純化之目的，使用親和層析之相關基質，諸如麩胱甘肽結合樹脂、澱粉酶結合樹脂及鎳結合樹脂或鈷結合樹脂。該等基質中有許多可以「套組」形式獲得，諸如適用於（HIS<sub>6</sub>）融合搭配物之 Pharmacia GST 純化系統及 QIAexpress<sup>TM</sup> 系統（Qiagen）。作為另一實例，融合域可經選擇以有利於偵測 ActRIIa 多肽。該等偵測域之實例包括各種螢光蛋白（例如 GFP）以及「抗原決定基標籤」，其通常為特定抗體可用之短肽序列。特定單株抗體可易於使用之熟知抗原決定基標籤包括 FLAG、流感病毒紅血球凝集素（HA）及 c-myc 標籤。在一些狀況下，融合域具有蛋白酶裂解位點，諸如因子 Xa 或凝血酶之蛋白酶裂解位點，其允許相關蛋白酶部分消化融合蛋白且從而自其釋放重組蛋白。可接著

由後續層析分離使所釋放之蛋白質自融合域分離。在某些較佳具體實例中，ActRIIa 多肽與活體內穩定 ActRIIa 多肽之域（「穩定子」域）融合。「穩定」意謂增加血清半衰期之任何者，無論其係由於破壞減小、腎清除減小抑或其他藥物動力學效應而達成。已知與免疫球蛋白之 Fc 部分的融合賦予大範圍之蛋白質以所需藥物動力學特性。同樣地，與人血清白蛋白之融合可賦予所需特性。可選擇之其他類型融合域包括多聚（例如二聚、四聚）域及功能域（賦予其他生物功能）。

作為一特定實例，本發明提供使用包含與 Fc 域融合之 ActRIIa 之可溶性胞外域的融合蛋白（例如 SEQ ID NO: 6）治療或預防乳癌之方法。

THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
 VVVD(A)VSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPYEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK\*

視情況，Fc 域在諸如 Asp-265、離胺酸 322 及 Asn-434 之殘基處具有一或多處突變。在某些狀況下，具有此等突變中之一或多者（例如 Asp-265 突變）之突變 Fc 域相對於野生型 Fc 域與 Fcγ 受體結合之能力減小。在其他狀況下，具有此等突變中之一或多者（例如 Asn-434 突變）之突變 Fc 域相對於野生型 Fc 域與 I 類 MHC 相關 Fc 受體（FcRN）

結合之能力增加。一般應瞭解，Fc 域可包括免疫球蛋白之恆定區之較小或較大部分，其限制條件為所得「Fc 域」保留經雙硫鍵共價二聚之能力且形成相對穩定的可溶性蛋白。

應瞭解融合蛋白之不同元素可以與所要功能性相符之任何方式排列。舉例而言，可將 ActRIIa 多肽置放於異源域之 C 末端或者可將異源域置放於 ActRIIa 多肽之 C 末端。ActRIIa 多肽域與異源域在融合蛋白中無須相鄰，且其他域或胺基酸序列可包括於任一域之 C 末端或 N 末端中或介於該等域之間。

在某些具體實例中，根據本文所述之方法適用之 ActRIIa 多肽可含有一或多種能穩定 ActRIIa 多肽之修飾。舉例而言，該等修飾增強 ActRIIa 多肽之試管內半衰期，增強 ActRIIa 多肽之循環半衰期或減少 ActRIIa 多肽之蛋白水解降解。該等穩定化修飾包括（但不限於）：融合蛋白（包括，例如包含 ActRIIa 多肽及穩定子域之融合蛋白）、糖基化位點之修飾（包括，例如將糖基化位點添加至 ActRIIa 多肽中），及碳水化合物部分之修飾（包括，例如自 ActRIIa 多肽移除碳水化合物部分）。如本文所用之術語「穩定子域」不僅係指如在融合蛋白之狀況下的融合域（例如 Fc），而且包括諸如碳水化合物部分之非蛋白類修飾或諸如聚乙二醇之非蛋白類部分。

在某些具體實例中，本文所述之方法利用經分離及/或經純化形式之 ActRIIa 多肽，其係與其他蛋白質分離或以

其他方式實質上無其他蛋白質。ActRIIa 多肽一般將自重組性核酸藉由表現而產生。

### 3. 編碼 ActRIIa 多肽之核酸

本文提供編碼 ActRIIa 多肽（例如可溶性 ActRIIa 多肽）中之任一者（包括本文所揭示之片段、功能變體及融合蛋白）之經分離核酸及/或重組性核酸。舉例而言，SEQ ID NO: 4 編碼天然產生之人類 ActRIIa 前驅多肽，而 SEQ ID NO: 5 編碼經加工之 ActRIIa 胞外域。主題核酸可為單股或雙股。該等核酸可為 DNA 或 RNA 分子。此等核酸可（例如）在製造 ActRIIa 多肽之方法中使用或用作直接治療劑（例如在基因療法中）。

在某些方面中，編碼 ActRIIa 多肽之主題核酸應進一步理解為包括為 SEQ ID NO: 4 或 5 之變體的核酸。變體核苷酸序列包括因一或多處核苷酸取代、添加或缺失而不同之序列，諸如等位基因變體。

在某些具體實例中，本發明提供使用與 SEQ ID NO: 4 或 5 至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 一致之經分離核酸序列或重組性核酸序列治療或預防乳癌之方法。一般熟習此項技術者應瞭解，與 SEQ ID NO: 4 或 5 及 SEQ ID NO: 4 或 5 之變體互補之核酸序列亦處於本發明之範疇內。在其他具體實例中，本文所述之核酸序列可為經分離的、重組性的及/或與異源核苷酸序列融合，或在 DNA 文庫中。

在其他具體實例中，根據本文所述之方法適用之核酸

亦包括在高度嚴格條件下與 SEQ ID NO: 4 或 5 所表示之核苷酸序列、SEQ ID NO: 4 或 5 之互補序列或其片段雜交之核苷酸序列。一般熟習此項技術者應易於瞭解，可改變促進 DNA 雜交之適當嚴格度條件。舉例而言，吾人可在約 45°C 下於 6.0 × 氯化鈉/檸檬酸鈉 (SSC) 中進行雜交，接著在 50°C 下用 2.0 × SSC 洗滌。舉例而言，洗滌步驟中之鹽濃度可選自 50°C 下約 2.0 × SSC 之低嚴格度至 50°C 下約 0.2 × SSC 之高嚴格度。另外，洗滌步驟中之溫度可自室溫 (約 22°C) 之低嚴格度條件增至約 65°C 之高嚴格度條件。溫度與鹽均可改變，或可將溫度或鹽濃度保持恆定同時改變另一變數。在一具體實例中，本文所述之方法利用在室溫下 6 × SSC 之低嚴格度條件下雜交、接著在室溫下於 2 × SSC 中洗滌之核酸。

亦預期因遺傳密碼之簡并而不同於如 SEQ ID NO: 4 或 5 中所述之核酸的經分離核酸用於根據本文所述之方法而使用。舉例而言，許多胺基酸係由一個以上三聯體表示。指定同一胺基酸之密碼子或同義密碼子 (例如 CAU 及 CAC 為組胺酸之同義之密碼子) 可引起不影響蛋白質之胺基酸序列的「靜默」突變。然而，預期不引起主題蛋白質之胺基酸序列變化之 DNA 序列多態現象將存在於哺乳動物細胞當中。熟習此項技術者應瞭解，編碼特定蛋白質之核酸之一或多個核苷酸 (至多約 3-5% 之核苷酸) 的此等變化可因天然等位基因變化而存在於特定物種之個體當中。任何及所有該等核苷酸變化及所得胺基酸多態現象處於本發明

之範疇內。

在某些具體實例中，本文所述之重組性核酸可在表現構築體中與一或多個調節核苷酸序列以可操作方式連接。調節核苷酸序列一般將適於供表現用之宿主細胞。眾多類型之適當表現載體及合適之調節序列在此項技術中已知用於多種宿主細胞。典型地，該或該等調節核苷酸序列可包括（但不限於）：啟動子序列、前導序列或信號序列、核糖體結合位點、轉錄起始及終止序列、轉譯起始及終止序列，及強化子序列或活化子序列。如此項技術中已知之組成性或誘導性啟動子為本發明所涵蓋。啟動子可為天然產生之啟動子或組合一個以上啟動子之元素的雜合啟動子。表現構築體可存在於細胞中離合染色小體（諸如質體）上，或可將表現構築體插入染色體中。在一較佳具體實例中，表現載體含有可選擇標記基因以允許選擇經轉型之宿主細胞。可選擇標記基因在此項技術中已為熟知且將隨所使用之宿主細胞而變。

在某些方面中，本文所述之方法利用包含編碼 ActRIIa 多肽並與至少一個調節序列以可操作方式連接之核苷酸序列的表現載體。調節序列經技術認可且經選擇以引導 ActRIIa 多肽表現。因此，術語調節序列包括啟動子、強化子及其他表現控制元素。例示性調節序列描述於 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中。舉例而言，當與 DNA 序列以操作方式連接時控制該 DNA 序列表現之多種

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。該等有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即刻早期啟動子、RSV 啟動子、lac 系統、trp 系統、TAC 或 TRC 系統、表現由 T7 RNA 聚合酶引導之 T7 啟動子、噬菌體  $\lambda$  之主要操縱子及啟動子區、fd 鞘蛋白之控制區、3-磷酸甘油酸激酶或其他醣解酶之啟動子、酸性磷酸酶之啟動子（例如 Pho5）、酵母  $\alpha$ -交配型因子之啟動子、桿狀病毒系統之多面體啟動子及已知控制原核或真核細胞或其病毒之基因表現的其他序列，及其各種組合。應瞭解，表現載體之設計可視諸如待轉型之宿主細胞的選擇及/或欲待表現之蛋白質的類型而定。此外，亦應考慮載體之複本數、控制彼複本數之能力及由載體編碼之任何其他蛋白質（諸如抗生素標記）的表現。

本文所述之重組性核酸可藉由將所選殖之基因或其部分接合至適合用於原核細胞、真核細胞（酵母、鳥類、昆蟲或哺乳動物）或二者中之表現的載體中來產生。產生重組性 ActRIIa 多肽之表現媒劑包括質體及其他載體。舉例而言，合適之載體包括以下類型之質體：供原核細胞（諸如大腸桿菌（*E. coli*））中之表現用的衍生自 pBR322 之質體、衍生自 pEMBL 之質體、衍生自 pEX 之質體、衍生自 pBTac 之質體及衍生自 pUC 之質體。

一些哺乳動物表現載體含有有利於載體於細菌中繁殖之原核序列與一或多個在真核細胞中表現之真核轉錄單

元。衍生自 pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 及 pHyg 之載體為適合於真核細胞之轉染的哺乳動物表現載體之實例。一些此等載體經來自細菌質體（諸如 pBR322）之序列修飾以有利於原核細胞與真核細胞中之複製及耐藥性選擇。或者，病毒之衍生物，諸如牛乳頭狀瘤病毒（BPV-1）或愛-巴病毒（Epstein-Barr virus）（pHEBo、衍生自 pREP，及 p205），可用於在真核細胞中瞬間表現蛋白質。其他病毒（包括反轉錄病毒）表現系統之實例可見於下文基因療法傳遞系統之描述中。質體製備中及宿主有機體轉型中所使用之各種方法在此項技術中已為熟知。對於原核細胞與真核細胞之其他合適之表現系統以及一般重組程序，參見 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*，第 3 版，Sambrook, Fritsch 及 Maniatis 編 (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來表現重組性多肽。該等桿狀病毒表現系統之實例包括衍生自 pVL 之載體（諸如 pVL1392、pVL1393 及 pVL941）、衍生自 pAcUW 之載體（諸如 pAcUW1），及衍生自 pBlueBac 之載體（諸如含有 pBlueBac III 之  $\beta$ -gal）。

在一較佳具體實例中，載體將經設計用於在 CHO 細胞中產生主題 ActRIIa 多肽，該載體諸如 Pcmv-Script 載體（Stratagene, La Jolla, Calif.）、pcDNA4 載體（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）及 pCI-neo 載體（Promega, Madison,



Wisc.)。將顯而易見，主題基因構築體可用於促成主題 ActRIIa 多肽在於培養物中繁殖之細胞中表現，（例如）以產生包括融合蛋白或變體蛋白之蛋白質以供純化。

本案之揭示亦係關於經重組性基因轉染之宿主細胞，該重組性基因包括主題 ActRIIa 多肽中之一或多者的編碼序列（例如 SEQ ID NO: 4 或 5）。該宿主細胞可為任何原核細胞或真核細胞。舉例而言，本文所述之 ActRIIa 多肽可在諸如大腸桿菌之細菌細胞、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。其他合適之宿主細胞為熟習此項技術者所知。

本文亦提供產生主題 ActRIIa 多肽之方法。舉例而言，可在適當條件下培養經編碼 ActRIIa 多肽之表現載體轉染之宿主細胞以允許 ActRIIa 多肽之表現發生。可使 ActRIIa 多肽自含有 ActRIIa 多肽之細胞與培養基之混合物分泌並分離。或者，可使 ActRIIa 多肽保持於細胞質中或膜部分中，且將細胞收集、溶解並分離蛋白質。細胞培養物包括宿主細胞、培養基及其他副產物。供細胞培養用之合適培養基在此項技術中已為熟知。可使用此項技術中已知用於純化蛋白質之技術使主題 ActRIIa 多肽自細胞培養基、宿主細胞或二者分離，該等技術包括離子交換層析、凝膠過濾層析、超濾、電泳、使用對 ActRIIa 多肽之特定抗原決定基具特異性之抗體進行免疫親和純化及使用結合與 ActRIIa 多肽融合之域的試劑進行親和純化（例如，蛋白質 A 管柱可用於純化 ActRIIa-Fc 融合體）。在一較佳具體

實例中，ActRIIa 多肽為含有有利於其純化之域的融合蛋白。在一較佳具體實例中，純化係由一系列管柱層析步驟達成，該等管柱層析步驟包括（例如）以任何次序進行之以下各者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、尺寸排阻層析及陽離子交換層析。純化可以病毒過濾及緩衝液交換來完成。如本文所證實，ActRIIa-hFc 蛋白經純化至如由尺寸排阻層析所測定 >98% 且如由 SDS PAGE 所測定 >95% 之純度。此純度足以在小鼠、大鼠及非人類靈長類動物中達成所需結果。

在另一具體實例中，編碼純化前導序列，諸如處於重組性 ActRIIa 多肽之所要部分之 N 末端的多聚(His)/腸激酶裂解位點序列的融合基因可允許由親和層析使用  $\text{Ni}^{2+}$  金屬樹脂純化所表現之融合蛋白。可接著藉由用腸激酶處理來隨後移除純化前導序列以提供經純化之 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熟知。基本上，編碼不同多肽序列之各種 DNA 片段的接合係根據習知技術，使用供接合用之鈍端或交錯端末端、提供適當末端之限制酶消化、適當時黏性末端之填入、避免不合需要之接合的鹼性磷酸酶處理及酶促接合來進行。在另一具體實例中，融合基因可由包括自動化 DNA 合成器之習知技術來合成。或者，基因片段之 PCR 擴增可使用錨定引子來進行，該等錨定引子在兩個連續基因片段之間產生互補懸垂體，隨後可

使該兩個連續基因片段黏接以產生嵌合基因序列（參見，例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel 等人編, John Wiley & Sons: 1992）。

#### 4. 替代活化素及 ActRIIa 拮抗劑

本案之揭示係關於使用活化素-ActRIIa 信號轉導之拮抗劑治療或預防乳癌之方法。儘管可溶性 ActRIIa 多肽且尤其 ActRIIa-Fc 為較佳拮抗劑且儘管該等拮抗劑可經不同於活化素拮抗（例如，活化素抑制可為藥劑抑制可能包括 TGF- $\beta$  超家族之其他成員的分子譜之活性之趨勢的指標，且該集合抑制可對乳癌細胞生長或存活產生所要影響）之機制影響乳癌細胞生長或存活，但預期其他類型之活化素-ActRIIa 拮抗劑為適用的，包括抗活化素（例如活化素  $\beta_A$ 、 $\beta_B$ 、 $\beta_C$  及  $\beta_E$ ）抗體、抗 ActRIIa 抗體、抑制 ActRIIa 產生之反義 RNAi 或核糖核酸酶核酸，及活化素或 ActRIIa 之其他抑制劑，尤其破壞活化素-ActRIIa 結合之彼等抑制劑。在某些具體實例中，對活化素 B 具特異性之拮抗劑（例如，抗活化素 B 抗體）適用於本發明之方法。

與 ActRIIa 多肽（例如可溶性 ActRIIa 多肽）特異性反應且與 ActRIIa 多肽競爭性地結合配位體或以其他方式抑制 ActRIIa 介導之信號轉導的抗體可用作 ActRIIa 多肽活性之拮抗劑。同樣地，與活化素  $\beta_A$ 、 $\beta_B$ 、 $\beta_C$  或  $\beta_E$  多肽或其任何異源二聚體特異性反應且破壞 ActRIIa 結合之抗體可用作拮抗劑。

藉由使用衍生自 ActRIIa 多肽或活化素多肽之免疫

原，抗蛋白/抗肽抗血清或單株抗體可由標準方案製成（參見，例如 *Antibodies: A Laboratory Manual* 由 Harlow 及 Lane 編 (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 ActRIIa 多肽、能引出抗體反應之抗原片段，或融合蛋白免疫。賦予蛋白質或肽以免疫原性之技術包括與載劑結合或此項技術中所熟知之其他技術。可在佐劑存在下投予 ActRIIa 或活化素多肽之免疫原性部分。免疫之進程可藉由偵測血漿或血清中之抗體效價來監測。標準 ELISA 或其他免疫檢定可與作為抗原之免疫原一起使用以評估抗體含量。

用 ActRIIa 多肽之抗原製劑使動物免疫後，可獲得抗血清且必要時可自血清分離多株抗體。為產生單株抗體，可自經免疫之動物收集抗體產生細胞（淋巴細胞）且由標準體細胞融合程序使其與永生化細胞（諸如骨髓瘤細胞）融合以得到融合瘤細胞。該等技術在此項技術中已為熟知，且包括（例如）融合瘤技術（最初由 Kohler 及 Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497 開發）、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（Cole 等人, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. 第 77-96 頁）。可以免疫化學方式篩選融合瘤細胞以產生與 ActRIIa 多肽特異性反應之抗體及自包含該等融合瘤細胞之培養物分離之單株抗體。亦可藉由篩選抗體可變域或 Fab 片段之文庫（例如噬菌體呈現文庫）以鑑別與所

選抗原（例如活化素或 ActRIIa）結合之結合劑來產生抗體。此試管內方法通常適用於在哺乳動物之間、尤其小鼠與人類之間高度保守之蛋白質。

如本文所用之術語「抗體」意欲包括整個抗體，例如任何同型（IgG、IgA、IgM、IgE等）之整個抗體，且包括與所選抗原反應之免疫球蛋白之片段或域。可使用習知技術使抗體片段化且針對效用及/或與受關注特定抗原決定基的相互作用來篩選片段。因此，該術語包括抗體分子之能與某種蛋白選擇性反應之經蛋白質裂解或經重組製備之部分的片段。該等蛋白水解片段及/或重組片段之非限制性實例包括含有由肽連接子接合之 V[L]及/或 V[H]域之 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv 及單鏈抗體（scFv）。scFv 可共價或非共價連接以形成具有兩個或兩個以上結合位點之抗體。術語抗體亦包括抗體及重組性抗體之多株、單株或其他經純化製劑。術語「重組性抗體」意謂自己使用分子生物學技術構築之核酸表現之抗體或免疫球蛋白之抗原結合域，諸如自單鏈抗體形成之人類化抗體或完全人類抗體。單域抗體及單鏈抗體亦包括於術語「重組性抗體」內。

在某些具體實例中，本文所述之方法可利用抗體，諸如單株抗體。亦提供產生新穎抗體之方法。舉例而言，產生與 ActRIIa 多肽或活化素多肽特異性結合之單株抗體之方法可包含將一定量之包含有效刺激可偵測免疫反應之抗原多肽的免疫原性組合物投予小鼠，自該小鼠獲得抗體產生細胞（例如，來自脾之細胞）且使該等抗體產生細胞與

骨髓瘤細胞融合以獲得抗體產生融合瘤，且測試該等抗體產生融合瘤以鑑別產生與抗原特異性結合之單株抗體的融合瘤。一旦獲得，即可在細胞培養物中、視情況在衍生自融合瘤之細胞產生與抗原特異性結合之單株抗體的培養條件下使融合瘤繁殖。可自細胞培養物純化單株抗體。

如關於抗體所用之形容詞「與...特異性反應之」意欲意謂，如此項技術中一般瞭解，抗體在受關注抗原（例如 ActRIIa 多肽）與其他非受關注抗原之間具足夠選擇性使得該抗體適用於在最小量下偵測特定類型之生物樣本中受關注抗原的存在。在使用抗體之某些方法（諸如治療性應用）中，較高結合特異性程度可為所需的。單株抗體一般具有有效區分所要抗原與交叉反應多肽之較大趨勢（與多株抗體相比）。一種影響抗體:抗原相互作用之特異性的特徵為抗體對抗原之親和力。儘管所要特異性可以一定範圍之不同親和力來達成，但一般較佳之抗體將具有約  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  M 或更小之親和力（解離常數）。

另外，用於篩選抗體以鑑別所需抗體之技術可影響所獲得之抗體之特性。舉例而言，若抗體有待用於結合溶液中之抗原，則可能需要測試溶液結合性。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別尤其所需之抗體。該等技術包括 ELISA、表面電漿共振結合檢定（例如 Biacore™ 結合檢定，Biacore AB, Uppsala, Sweden）、夾心檢定（例如 IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland 之順磁性珠粒系統）、西方墨點法、免疫沈澱檢

定及免疫組織化學法。

作為活化素或 ActRIIa 拮抗劑之核酸化合物之類別的實例包括反義核酸、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懸垂或非互補之區域，其中該等股中之一者或另一者為單股。單股化合物可包括自我互補之區域，其意謂該化合物形成具有雙螺旋結構區之所謂「髮夾」或「莖環」結構。核酸化合物可包含與由全長 ActRIIa 核酸序列或活化素  $\beta_A$ 、 $\beta_B$ 、 $\beta_C$  或  $\beta_E$  核酸序列之不超過 1000 個、不超過 500 個、不超過 250 個、不超過 100 個或不超過 50 個、35 個、25 個、22 個、20 個、18 個或 15 個核苷酸組成之區域互補的核苷酸序列。互補區較佳將為至少 8 個核苷酸及視情況約 18 個至 35 個核苷酸。互補區可屬於靶轉錄物之內含子、編碼序列或非編碼序列，諸如編碼序列部分。一般而言，核酸化合物將具有長度為約 8 個至約 500 個核苷酸或鹼基對之長度，且視情況該長度將為約 14 個至約 50 個核苷酸。核酸可為 DNA（尤其用作反義 DNA）、RNA 或 RNA:DNA 雜合體。任一股可包括 DNA 與 RNA 之混合物，以及不能容易地歸類為 DNA 或 RNA 之經修飾形式。同樣地，雙股化合物可為 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歸類為 DNA 或 RNA 之經修飾形式。核酸化合物可包括多種修飾中之任一者，其包括對骨架（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。反義核酸化合物較佳將具有約 15 個至約 30 個核苷酸之長度且通常將含有一或多種修飾以改良以下特徵：諸如在血清中、細胞中或化合物可能被傳遞到之處(諸如在經口傳遞之化合物的狀況下於胃中及對於吸入型化合物而言於肺中)的穩定性。在 RNAi 構築體之狀況下，與靶轉錄物互補之股一般將為 RNA 或其修飾形式。另一股可為 RNA、DNA 或任何其他變化形式。雙股或單股「髮夾」RNAi 構築體之雙鏈體部分一般將具有長度為 18 個至 40 個核苷酸之長度且視情況長度為約 21 個至 23 個核苷酸，只要其充當 Dicer 受質即可。催化或酶促核酸可為核糖核酸酶或 DNA 酶且亦可含有經修飾之形式。核酸化合物當在生理條件下及以無義或有義對照具有極少或無作用之濃度與細胞接觸時可將靶之表現抑制約 50%、75%、90% 或更多。測試核酸化合物之作用的較佳濃度為 1、5 及 10 微莫耳。亦可針對對(例如)乳癌細胞或乳腺腫瘤之增殖或存活的影响來測試核酸化合物。

##### 5. 篩選檢定

在某些方面中，本發明係關於 ActRIIa 多肽(例如可溶性 ActRIIa 多肽)及活化素多肽鑑別作為活化素-ActRIIa 信號轉導路徑之促效劑或拮抗劑之化合物(藥劑)的用途。可測試經此篩選所鑑別之化合物以評估其調節活體內或試管內癌細胞、尤其乳癌細胞生長或存活之能力。此等化合物可(例如)在諸如小鼠異種移植模型之動物模型中測試。一種適用之動物模型為鼠類 MDA-MB231 乳癌模型；



MDA-MB231 細胞為激素非依賴性的且易於轉移至骨。乳癌之其他動物模型可(例如)基本上如由 Drebin 等人 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9129-9133 (1986)所述,藉由將大鼠神經母細胞瘤細胞(neu 致癌基因最初自其分離)或經 neu 轉型之 NIH-3T3 細胞植入裸鼠中而產生。

存在眾多方法以篩選藉由靶向活化素及 ActRIIa 信號轉導而治療或預防乳癌之治療劑。在某些具體實例中,可進行化合物之高產量篩選以鑑別擾動活化素或 ActRIIa 介導之對所選細胞系之影響的藥劑。在某些具體實例中,進行檢定以篩選併鑑別特異性抑制或減少 ActRIIa 多肽與活化素結合之化合物。或者,可使用檢定以鑑別增強 ActRIIa 多肽與活化素結合之化合物。在又一具體實例中,可由化合物與活化素或 ActRIIa 多肽相互作用之能力來鑑別該等化合物。

多種檢定格局將足夠,且根據本案之揭示,本文中未明確描述之彼等檢定格局仍為一般熟習此項技術者所瞭解。如本文所述,測試化合物(藥劑)可由任何組合化學方法產生。或者,主題化合物可為活體內或試管內合成之天然產生生物分子。有待於針對充當組織生長之調節劑的能力進行測試之化合物(藥劑)可(例如)由細菌、酵母、植物或其他有機體產生(例如天然產物),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。本文所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。在一特定具體實例中,

測試藥劑為具有小於約 2,000 道爾頓之分子量的小有機分子。

測試化合物可以單一離散實體形式提供，或提供於具有較高複雜性之文庫（諸如由組合化學所製成之文庫）中。此等文庫可包含（例如）醇、烷基鹵化物、胺、醯胺、酯、醛、醚及其他種類之有機化合物。測試化合物至測試系統之呈現可呈經分離之形式或呈化合物之混合物形式（尤其在初始篩選步驟中）。視需要，化合物可視情況經其他化合物衍生化且具有有利於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、地高辛（digoxigenin）、綠色螢光蛋白、同位素、多組胺酸、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提取物之文庫的許多藥物篩選程式中，需要高產量檢定以使給定時段中調查之化合物的數目最大。在諸如可以經純化或經半純化之蛋白質得出之無細胞系統中所進行之檢定通常較佳作為「初級」篩選，因為可產生該等檢定以允許快速顯影且相對容易地偵測由測試化合物介導之分子靶的變異。此外，在試管內系統中一般可忽略測試化合物之細胞毒性或生物可用性的作用，檢定替代地主要集中於藥物對分子靶的影響，該影響可在 ActRIIa 多肽與活化素之間的結合親和力之變異中顯現。

僅為說明起見，在一例示性篩選檢定中，使受關注化合物與通常能與活化素結合之經分離及經純化 ActRIIa 多

肽接觸。接著將含有 ActRIIa 配位體之組合物添加至化合物與 ActRIIa 多肽之混合物中。ActRIIa/活化素複合物的偵測及量化提供測定化合物抑制（或加強）ActRIIa 多肽與活化素之間的複合物形成之功效的方式。化合物之功效可藉由自使用多個濃度之測試化合物獲得之數據產生劑量反應曲線來評估。此外，亦可進行對照檢定以提供比較用之基線。舉例而言，在對照檢定中，將經分離及經純化之活化素添加至含有 ActRIIa 多肽之組合物中，且在不存在測試化合物下對 ActRIIa/活化素複合物的形成進行定量。應瞭解，一般而言，混合反應物之次序可改變，且可同時混合。此外，替代經純化之蛋白質，可使用細胞提取物及溶解產物以促成合適之無細胞檢定系統。

ActRIIa 多肽與活化素之間的複合物形成可由多種技術來偵測。舉例而言，複合物形成之調節可使用（例如）諸如經放射性標記（例如  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$  或  $^3\text{H}$ ）、經螢光標記（例如 FITC）或經酶促標記之 ActRIIa 多肽或活化素之經可偵測標記蛋白質，由免疫檢定或由層析偵測進行定量。

在某些具體實例中，螢光偏振檢定及螢光共振能量轉移（FRET）檢定可用於直接或間接量測 ActRIIa 多肽與其結合蛋白之間的相互作用程度。其他合適之偵測模式包括（例如）基於光波導（PCT 公開案 WO 96/26432 及美國專利第 5,677,196 號）、表面電漿共振（SPR）、表面電荷感測器及表面力感測器之彼等偵測模式。

相互作用陷阱檢定（亦稱為「雙雜交檢定」）亦可用於鑑別破壞或加強 ActRIIa 多肽與其結合蛋白之間的相互作用之藥劑。參見，例如美國專利第 5,283,317 號；Zervos 等人(1993) Cell 72:223-232；Madura 等人(1993) J Biol Chem 268:12046-12054；Bartel 等人(1993) Biotechniques 14:920-924；及 Iwabuchi 等人(1993) Oncogene 8:1693-1696。在一特定具體實例中，反向雙雜交系統可用於鑑別使 ActRIIa 多肽與其結合蛋白之間的相互作用解離之化合物（例如小分子或肽）。參見，例如 Vidal 及 Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29；Vidal 及 Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81；及美國專利第 5,525,490 號、第 5,955,280 號及第 5,965,368 號。

在某些具體實例中，由化合物與本文所述之 ActRIIa 或活化素多肽相互作用之能力來鑑別該等化合物。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的。舉例而言，該相互作用可在蛋白質水平上使用包括光交聯、經放射性標記之配位體結合及親和層析之試管內生物化學方法來鑑別（Jakoby WB 等人，1974, Methods in Enzymology 46: 1）。在某些狀況下，化合物可在基於機制之檢定中篩選，該檢定諸如偵測與活化素或 ActRIIa 多肽結合之化合物的檢定。其可包括固相或液相結合事件。或者，可將編碼活化素或 ActRIIa 多肽之基因經報導體系（例如  $\beta$ -半乳糖苷酶、螢光素酶或綠色螢光蛋白）轉染至細胞中且視情況由高產量篩選針對文庫或以該文庫之個

別成員進行篩選。可使用其他基於機制之結合檢定，例如偵測自由能變化之結合檢定。可用固定於孔、珠粒或晶片或由經固定抗體捕捉或由毛細電泳法解析之靶來進行結合檢定。通常可使用比色法或螢光法或表面電漿共振來偵測所結合之化合物。

#### 6. 例示性治療用途

在某些具體實例中，本發明提供藉由將治療有效量之活化素-ActRIIa 拮抗劑（諸如 ActRIIa 多肽）投予有需要之個體來治療或預防該個體之乳癌的方法。此等方法可用於具有發展乳癌之高危險之人類、尤其女性的治療性治療以及預防性治療。當每一女性處於發展乳癌之危險中時，具有發展乳癌之高危險之女性為與一般群體或處於某年齡組內之女性群體相比其危險因子賦予發展該疾病之較大機率的女性。例示性危險因子包括年齡、家族病史或遺傳組成、生活習性（諸如鍛煉及膳食）、暴露於放射線或其他致癌劑、第一個小孩出生時之年齡、遺傳變化及停經後增重。

如本文所用之「預防」病症或病狀之治療劑係指在統計樣本中，相對於未經治療之對照樣本減少經治療樣本之病症或病狀的發生或相對於未經治療之對照樣本延緩病症或病狀之一或多種症狀或特徵之發作的化合物。舉例而言，預防乳癌可指代繼治療後不存在新病變，或不存在或延緩轉移性疾病。

術語「治療乳癌」係指相對於未經治療之對照或相對

於治療前疾病之嚴重性，疾病之一或多種症狀或特徵的改良。該術語不必需要接受治療之患者被治癒或疾病完全自患者根除。治療乳癌之藥劑可為降低疾病之一或多種症狀或特徵之嚴重性的藥劑。應注意，腫瘤生長及進程受多種因素影響，該等因素包括細胞週期進程及細胞分裂之介體及細胞死亡或細胞凋亡之調節劑。因此，治療乳癌可涉及癌細胞增殖減少或細胞分裂之速率減小。其他或另外，治療乳癌可涉及癌細胞存活減少，細胞凋亡增加，或轉移性乳癌、尤其骨骼之轉移性乳癌之發生或嚴重性降低。因此，在某些具體實例中，治療乳癌可涉及細胞分裂減少與細胞死亡增加。無論機制如何，藥劑在治療乳癌方面之有效性可由可觀測之計量來確定，該等計量諸如與對照相比癌細胞之數目較少（歸因於增殖減少、凋亡增加或二者）或與對照相比腫瘤尺寸減小。因此，治療乳癌或抑制腫瘤細胞或癌細胞生長關於該變化發生之機制意欲為中性的。預防與治療可在醫師或其他健康護理工作者所提供之診斷及投予治療劑所欲之結果的分析中辨別。

當觀測主題拮抗劑對人類之乳癌進程的影響時，影響可藉由可量測之疾病減少或消失及/或新病變不存在或預防轉移來評估。舉例而言，活化素-ActRIIa 拮抗劑可顯著降低或延緩患有非侵襲性乳癌與侵襲性乳癌之患者的乳癌進程。另外，該等拮抗劑可預防或減少在具有乳癌之危險因子的健康女性中發展該疾病之危險。拮抗劑亦可減少在具有乳癌之病史的患者中該疾病復發之危險。

因此，活化素-ActRIIa 拮抗劑可用於預防或延緩乳癌被視為處於發展該疾病之危險中之個體中發作，且該等拮抗劑可在所選患者群體中使用。適當患者群體之實例包括具有乳癌及卵巢癌之家族病史之患者，諸如母親或姐妹已經診斷患有該疾病之女性患者。亦包括於 BRCA1/2 基因或其他基因中具有據顯示使女性易患乳癌或卵巢癌之突變的患者。在一具體實例中，將被視為處於發展乳癌之高危險中但尚未診斷患有該疾病之患者用活化素-ActRIIa 拮抗劑治療。當患者達到 30 歲、35 歲或 40 歲之年齡時或當女性患者不打算懷孕（亦即，患者不計劃撫育嬰兒）或已達到停經期時，該治療可開始。尤其，本文所呈現之資料證實活化素-ActRIIa 拮抗劑抑制引入一般循環中之乳癌細胞系的轉移性擴散，此證實該等拮抗劑可適用於預防乳腺腫瘤轉移。該等化合物將適用於治療已經診斷患有乳癌或疑患乳癌之任何患者。另外，因發展乳癌之危險升高而正考慮進行預防性或非急需施行之乳房切除術的患者可替代地或另外選擇採用活化素-ActRIIa 拮抗劑以減小未偵測之腫瘤之轉移性擴散的危險。

本文所揭示之活化素-ActRIIa 拮抗劑且尤其 ActRIIa-Fc 蛋白可用於治療或預防包括患有實體腫瘤之患者以及患有轉移性癌症之患者的患者之乳癌。亦可將活化素-ActRIIa 拮抗劑投予患有乳房之癌前或良性病變或患有任何異常增生性病變之人類個體，該等異常增生性病變包括典型增生、非典型增生及非侵襲性癌瘤或原位癌瘤。本案之揭示

之拮抗劑亦適用於治療或預防激素依賴性或激素反應性癌症（例如雌激素受體陽性癌症）與激素非依賴性癌症（例如雌激素受體陰性癌症或雌激素受體突變癌症）。活化素-ActRIIa 拮抗劑亦適用作生長因子或致癌基因經活化之癌症（例如，表現 *c-erbB-2*（亦稱為 *HER-2/Neu*）酪胺酸激酶之乳癌）的治療劑。活化素-ActRIIa 拮抗劑可證明尤其適用於表現升高（相對於正常乳房組織衍生細胞）量之活化素（例如 A、AB 或 B）或升高量之 ActRIIa 或 ActRIIb 的腫瘤。

本發明認識到習知癌症療法（例如化學療法、放射線療法、光線療法、免疫療法及手術）之有效性可經使用主題拮抗劑而得以增強。因此，活化素-ActRIIa 拮抗劑可以組合療法使用從而治療、預防或控制乳癌。可將拮抗劑與放射線及/或手術治療組合以及與細胞毒性化學療法及/或內分泌療法組合施予患者。該等組合治療可協同起作用且允許個別治療中之每一者之劑量減少，從而降低較高劑量下各治療所引起之有害副作用。在其他情況下，治療所難治癒之惡性疾病可回應兩種或兩種以上不同治療之組合療法。因此，本案之揭示係關於伴隨或相繼投予與另一習知抗贅生劑組合之活化素-ActRIIa 拮抗劑，以增強抗贅生劑之治療作用或克服對該抗贅生劑之細胞抗性。

可用於組合抗腫瘤療法之醫藥化合物包括（僅為說明起見）：胺魯米特（aminoglutethimide）、安吡啶（amsacrine）、安美達錠（anastrozole）、天冬醯胺酶、bcg、比卡魯胺



( bicalutamide ) 、博萊黴素 ( bleomycin ) 、布舍瑞林 ( buserelin ) 、白消安 ( busulfan ) 、喜樹鹼 ( camptothecin ) 、卡西他賓 ( capecitabine ) 、卡鉑 ( carboplatin ) 、卡莫司汀 ( carmustine ) 、苯丁酸氮芥 ( chlorambucil ) 、順鉑 ( cisplatin ) 、克拉屈濱 ( cladribine ) 、氯屈麟酸鹽 ( clodronate ) 、秋水仙鹼 ( colchicine ) 、環磷醯胺、環丙孕酮 ( cyproterone ) 、阿糖胞苷 ( cytarabine ) 、達卡巴嗪 ( dacarbazine ) 、放線菌素 D ( dactinomycin ) 、道諾黴素 ( daunorubicin ) 、雙烯雌酚 ( dienestrol ) 、乙烯雌酚 ( diethylstilbestrol ) 、歐洲紫杉醇 ( docetaxel ) 、羥道諾紅黴素 ( doxorubicin ) 、表柔比星 ( epirubicin ) 、雌二醇 ( estradiol ) 、雌莫司汀 ( estramustine ) 、依託泊苷 ( etoposide ) 、依西美坦 ( exemestane ) 、非格司亭 ( filgrastim ) 、氟達拉濱 ( fludarabine ) 、氟氫可的松 ( fludrocortisone ) 、氟尿嘧啶、氟甲辜酮 ( fluoxymesterone ) 、氟他胺 ( flutamide ) 、吉西他濱 ( gemcitabine ) 、染料木素 ( genistein ) 、戈舍瑞林 ( goserelin ) 、羥基脲、黃膽素 ( idarubicin ) 、異環磷醯胺 ( ifosfamide ) 、伊馬替尼 ( imatinib ) 、干擾素 ( interferon ) 、伊立替康 ( irinotecan ) 、伊諾替康 ( irinotecan ) 、來曲唑 ( letrozole ) 、甲醯四氫葉酸 ( leucovorin ) 、亮內瑞林 ( leuprolide ) 、左旋咪唑 ( levamisole ) 、洛莫司汀 ( lomustine ) 、二氯甲基二乙胺 ( mechlorethamine ) 、甲羥孕酮 ( medroxyprogesterone ) 、甲地孕酮 ( megestrol ) 、

美法侖 (melphalan)、巯基嘌呤、美司鈉 (mesna)、甲胺喋呤 (methotrexate)、絲裂黴素 (mitomycin)、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、尼魯米特 (nilutamide)、諾考達唑 (nocodazole)、奧曲肽 (octreotide)、奧賽力鉑 (oxaliplatin)、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、帕米膦酸鹽 (pamidronate)、噴司他丁 (pentostatin)、普卡黴素 (plicamycin)、卟吩姆 (porfimer)、丙卡巴肼 (procarbazine)、雷替曲塞 (raltitrexed)、利妥昔單抗 (rituximab)、鏈脲黴素 (streptozocin)、蘇拉明 (suramin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、替莫唑胺 (temozolomide)、替尼泊甙 (teniposide)、睪固酮 (testosterone)、硫鳥嘌呤、噻替派 (thiotepa)、二氯二茂鈦 (titanocene dichloride)、拓朴替康 (topotecan)、曲妥珠單抗 (trastuzumab)、維甲酸 (tretinoin)、長春鹼 (vinblastine)、長春新鹼 (vincristine)、長春地辛 (vindesine) 及長春瑞濱 (vinorelbine)。

此等化學治療性抗腫瘤化合物可由其作用機制分成(例如)下列組：抗代謝物/抗癌劑，諸如嘧啶類似物 (5-氟尿嘧啶、氟尿苷 (floxuridine)、卡西他賓、吉西他濱及阿糖胞苷) 及嘌呤類似物、葉酸拮抗劑及相關抑制劑 (巯基嘌呤、硫鳥嘌呤、噴司他丁及 2-氯脫氧腺苷 (克拉屈濱))；抗增殖/抗有絲分裂劑，包括諸如長春生物鹼 (長春鹼、長春新鹼及長春瑞濱) 之天然產物，諸如紫杉烷 (taxane) (太平洋紫杉醇、歐洲紫杉醇)、長春新鹼、長春鹼、諾

考達唑、埃博黴素 (epothilones) 及諾維本 (navelbine) 之微管破裂劑，表鬼白毒素 (epididodophyllotoxin) (依託泊苷、替尼泊甙)，DNA 損傷劑(放線菌素( actinomycin)、安吡啶、蒽環黴素 (anthracycline)、博萊黴素、白消安、喜樹鹼、卡鉑、苯丁酸氮芥、順鉑、環磷醯胺、環磷氮芥 (cytoxan)、放線菌素 D、道諾黴素、羥道諾紅黴素、表柔比星、六甲基三聚氰胺奧賽力鉑 ( hexamethylmelamineoxaliplatin )、異環磷醯胺 ( iphosphamide)、美法侖、二氯甲基二乙胺、絲裂黴素、米托蒽醌、亞硝基脲、普卡黴素、丙卡巴肼、紫杉酚( taxol)、紫杉德 ( taxotere)、替尼泊甙、三伸乙基硫代磷醯胺及依託泊苷 ( VP16))；抗生素，諸如放線菌素 D、道諾黴素、羥道諾紅黴素 (阿黴素 ( adriamycin))、黃膽素、蒽環黴素、米托蒽醌、博萊黴素、普卡黴素 (光輝黴素 (mithramycin)) 及絲裂黴素；酶 (全身代謝 L-天冬醯胺酸且剝奪不具有合成其自身天冬醯胺酸之能力之細胞的 L-天冬醯胺酶)；抗血小板劑；抗增殖/抗有絲分裂烷化劑，諸如氮芥 (二氯甲基二乙胺、環磷醯胺及類似物、美法侖、苯丁酸氮芥)、伸乙基亞胺及甲基三聚氰胺 (六甲基三聚氰胺及噻替派)、磺酸烷酯-白消安、亞硝基脲 (卡莫司汀 (BCNU) 及類似物、鏈脲黴素)、三氮烯 ( triazene) -達卡巴嗪 (DTIC)；抗增殖/抗有絲分裂抗代謝物，諸如葉酸類似物 (甲胺喋呤)；鉑配位錯合物 (順鉑、卡鉑)、丙卡巴肼、羥基脲、米托坦、胺魯米特；激素、激素類似

物（雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡魯胺、尼魯米特）及芳香酶抑制劑（來曲唑、安美達錠）；抗凝劑（肝素、合成肝素鹽及其他凝血酶抑制劑）；纖維蛋白溶解劑（諸如組織纖維蛋白溶酶原活化劑、鏈激酶及尿激酶）、阿司匹靈（aspirin）、雙嘧達莫（dipyridamole）、噻氯匹定（ticlopidine）、氯吡格雷（clopidogrel）、阿昔單抗（abciximab）；抗遷移劑；抗分泌劑（貝拉維丁（breveldin））；免疫抑制劑（環孢黴素（cyclosporine）、他克莫司（tacrolimus, FK-506）、西羅莫司（sirolimus）（雷帕黴素（rapamycin））、硫唑嘌呤（azathioprine）、黴酚酸嗎啉乙酯（mycophenolate mofetil））；抗血管生成化合物（TNP-470, 染料木素）及生長因子抑制劑（血管內皮生長因子（VEGF）抑制劑、纖維母細胞生長因子（FGF）抑制劑）；血管收縮素受體阻斷劑；氧化氮供體；反義寡核苷酸；抗體（曲妥珠單抗）；細胞週期抑制劑及分化誘導劑（維甲酸）；mTOR 抑制劑、拓撲異構酶抑制劑（羥道諾紅黴素（阿黴素）、安吡啶、喜樹鹼、道諾黴素、放線菌素 D、伊尼泊甌（eniposide）、表柔比星、依託泊苷、黃膽素及米托蒽醌、拓朴替康、伊立替康）、皮質類固醇（皮質酮（cortisone）、地塞米松（dexamethasone）、氫化可的松（hydrocortisone）、甲潑尼龍（Methylprednisolone）、潑尼松（prednisone）及潑尼龍（prednisolone））；生長因子信號轉導激酶抑制劑；粒線體功能不良誘導劑及卡斯蛋白酶活化劑；及染色質破壞

劑。

在某些具體實例中，可用於組合療法之醫藥化合物包括抗血管生成劑，諸如（1）諸如 bFGF（基本纖維母細胞生長因子）之「血管生成分子」釋放之抑制劑；（2）血管生成分子之中和劑，諸如抗  $\beta$ bFGF 抗體；及（3）對血管生成刺激之內皮細胞反應之抑制劑，包括膠原酶抑制劑、基底膜轉換抑制劑、血管生成抑制類固醇、衍生自真菌之血管生成抑制劑、血小板因子 4、凝血栓蛋白（thrombospondin）、關節炎藥物（諸如 D-青黴胺（D-penicillamine）及硫代蘋果酸金）、維生素 D3 類似物、 $\alpha$ -干擾素及類似物。對於另外提出之血管生成抑制劑，參見 Blood 等人，*Bioch. Biophys. Acta.*, 1032:89-118 (1990)；Moses 等人，*Science*, 248:1408-1410 (1990)；Ingber 等人，*Lab. Invest.*, 59:44-51 (1988)；及美國專利第 5,092,885 號、第 5,112,946 號、第 5,192,744 號、第 5,202,352 號及第 6573256 號。另外，存在多種可用於抑制血管生成之化合物，例如阻斷 VEGF 介導之血管生成路徑之肽或藥劑、內皮生長抑素蛋白或衍生物、血管生長抑素之離胺酸結合片段、黑色素或黑色素促進化合物、纖溶酶原片段（例如纖溶酶原之半胱胺酸捲曲區 1-3）、肌鈣蛋白（tropoin）子單元、玻璃連結蛋白  $\alpha v \beta 3$  之拮抗劑、衍生自鞘脂激活蛋白 B（Saposin B）之肽、抗生素或類似物（例如四環素（tetracycline）或新黴素（neomycin））、含地諾孕素（dienogest）組合物、包含與肽偶合之 MetAP-2 抑制核心

之化合物、化合物 EM-138、查耳酮 (chalcone) 及其類似物，及酸性二肽酶 (naaladase) 抑制劑。參見，例如美國專利第 6,395,718 號、第 6,462,075 號、第 6,465,431 號、第 6,475,784 號、第 6,482,802 號、第 6,482,810 號、第 6,500,431 號、第 6,500,924 號、第 6,518,298 號、第 6,521,439 號、第 6,525,019 號、第 6,538,103 號、第 6,544,758 號、第 6,544,947 號、第 6,548,477 號、第 6,559,126 號及第 6,569,845 號。

視組合療法之性質而定，可持續投予本發明之治療拮抗劑，同時施予及/或其後施予其他療法。本文所述之拮抗劑的投藥可以單次劑量或以多次劑量進行。在一些情況下，拮抗劑的投藥在習知療法之前至少數天開始，而在其他情況下，投藥係在施予習知療法前即刻開始或在施予習知療法時開始。

#### 7. 醫藥組合物

在某些具體實例中，將本文所述之活化素-ActRIIa 拮抗劑與醫藥學上可接受之載劑一起調配。舉例而言，可單獨或作為醫藥調配物（治療組合物）之組份投予 ActRIIa 多肽。主題拮抗劑可經調配用於以任何便利方式投藥以在人類或獸醫醫學中使用。

在某些具體實例中，治療或預防如本文所述之乳癌之方法包括以植入物或裝置之形式全身或局部投予組合物。當投予時，用於本發明之治療組合物當然係呈無熱原質、生理學上可接受之形式。亦可視情況包括於如上所述之組

合物中之不同於活化素-ActRIIa 拮抗劑的治療學上適用之藥劑可在本發明之方法中與主題拮抗劑同時或相繼投予。

典型地，活化素-ActRIIa 拮抗劑將非經腸投予。適合於非經腸投藥之醫藥組合物可包含一或多種 ActRIIa 多肽與一或多種醫藥學上可接受之無菌等張水溶液或非水溶液、分散液、懸浮液或乳液或可在臨用前復水成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末的組合，該等醫藥組合物可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、促使調配物與所欲接受者之血液等張的溶質，或懸浮劑或增稠劑。可在本發明之醫藥組合物中使用之合適水性載劑及非水載劑之實例包括水、乙醇、多元醇（諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及類似多元醇）及其合適之混合物、植物油（諸如橄欖油）及可注射之有機酯（諸如油酸乙酯）。可（例如）藉由使用塗層物質（諸如卵磷脂）、在分散液之狀況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。

另外，組合物可以供傳遞至目標組織部位（例如乳腺上皮）之形式囊封或注射。在某些具體實例中，本文所述之組合物可包括能將一或多種治療化合物（例如 ActRIIa 多肽）傳遞至目標組織部位（例如乳腺上皮）、提供使組織發育之結構且最佳能被再吸收至體內之基質。舉例而言，該基質可提供 ActRIIa 多肽的緩慢釋放。該等基質可由目前用於其他植入式醫學應用之材料形成。

基質材料之選擇係基於生物相容性、生物降解性、機械特性、美容外觀及界面特性。主題組合物之特定應用將

界定適當調配物。供組合物用之潛在基質可為生物可降解且經化學定義之硫酸鈣、磷酸三鈣、羥磷灰石、聚乳酸及聚酸酐。其他潛在材料為生物可降解的且經生物學上充分定義，諸如骨膠原蛋白或真皮膠原蛋白。其他基質包含純蛋白質或細胞外基質組份。其他潛在基質為非生物可降解的且經化學定義，諸如燒結羥磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽或其他陶瓷。基質可包含任何上文所提及類型之材料的組合，諸如聚乳酸與羥磷灰石或膠原蛋白與磷酸三鈣。生物陶瓷在組成（諸如鈣-鋁酸鹽-磷酸鹽）及加工方面可改變以改變孔徑、粒度、粒子形狀及生物降解性。

在某些具體實例中，可經口投予本文所述之拮抗劑，例如呈膠囊、扁膠劑、丸劑、錠劑、口含劑（使用調味基質，通常為蔗糖及阿拉伯膠（acacia）或黃耆膠）、散劑、顆粒之形式，或作為於水性或非水性液體中之溶液或懸浮液，或作為水包油或油包水液體乳液，或作為酏劑或糖漿，或作為片劑（使用惰性基質，諸如明膠及甘油，或蔗糖及阿拉伯膠）及/或作為漱口水及類似物，其各含有預定量之藥劑作為活性成份。拮抗劑亦可以大丸劑、舐劑或糊劑之形式投予。

在供經口投予之固體劑型（膠囊、錠劑、丸劑、糖衣藥丸、散劑、顆粒及類似物）中，可將一或多種治療拮抗劑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/或以下物質中之任一者混合：（1）填充劑或增補劑，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、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖及/或阿拉伯膠；(3) 保濕劑，諸如甘油；(4) 崩解劑，諸如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、褐藻酸、某些矽酸鹽及碳酸鈉；(5) 溶液阻滯劑，諸如石蠟；(6) 吸收促進劑，諸如四級銨化合物；(7) 濕潤劑，諸如十六烷醇及甘油單硬脂酸酯；(8) 吸收劑，諸如高嶺土(kaolin)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、十二烷基硫酸鈉及其混合物；及(10) 著色劑。在膠囊、錠劑及丸劑之狀況下，醫藥組合物亦可包含緩衝劑。類似類型之固體組合物亦可用作使用諸如乳糖以及高分子量聚乙二醇及類似物之賦形劑之軟性及硬性填充明膠膠囊中的填充劑。

供經口投予之液體劑型包括醫藥學上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿及醃劑。除活性成份以外，液體劑型可含有此項技術中常用之情性稀釋劑，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、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇，及脫水山梨糖醇之脂肪酸酯；及其混合物。除情性稀釋劑以外，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。

除活性化合物以外，懸浮液可含有懸浮劑(諸如乙氧基化異十八烷醇、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、瓊脂及黃耆膠及其混合物。

根據本文所述之方法適用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。可藉由包括例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及類似物之各種抗細菌劑及抗真菌劑來確保防止微生物作用。亦可能需要將諸如糖、氯化鈉及類似物之等張劑包括於組合物中。另外，可藉由包括延緩吸收之試劑（諸如單硬脂酸鋁及明膠）來促成可注射醫藥形式之延長吸收。

應瞭解適合於治療或預防乳癌之給藥方案將由主治醫師在考慮改變本發明之主題化合物（例如 ActRIIa 多肽）之作用的各種因素下確定。各種因素包括（但不限於）：患者年齡、性別及膳食，疾病嚴重性，投藥時間，及其他臨床因素。將其他已知之生長因子添加至最終組合物中亦可影響劑量。可藉由週期性評估包括（但不限於）腫瘤尺寸、階段或組織學級別、雌激素或孕酮受體狀況、血管浸潤及局部淋巴結轉移之各種因素來監測進程。臨床醫師亦可監測以下標記，諸如蛋白質 uPA/PAI1 之含量（uPA 及 PAI1 之高含量與轉移之高危險相關）及 Her-2 基因擴增及/或蛋白質表現（其亦與轉移相關）（Weigelt 等人 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602）。基因表現特徵研究（gene expression profiling）亦可證明有助於監測疾病進程（van't Veer 等人 2002 Nature 415: 530-536 及 van de Vijver 等人 2002 N. Engl. J. Med. 347: 1999-2009）。

在某些具體實例中，本發明亦提供治療或預防乳癌之方法，其涉及活體內產生 ActRIIa 多肽之基因療法。該療法會藉由將 ActRIIa 聚核苷酸序列引入乳癌中所涉及之細胞或組織（例如乳腺上皮細胞）中來達成其治療作用。ActRIIa 聚核苷酸序列的傳遞可使用重組性表現載體（諸如嵌合病毒）或膠狀分散系統來達成。對 ActRIIa 聚核苷酸序列之治療性傳遞而言較佳為使用所靶向之脂質體。

可用於如本文所教示之基因療法的各種病毒載體包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘或 RNA 病毒（諸如反轉錄病毒）。反轉錄病毒載體可為鼠類或鳥類反轉錄病毒之衍生物。可插有單一外來基因之反轉錄病毒載體之實例包括（但不限於）：莫洛尼鼠類白血病毒（Moloney murine leukemia virus, MoMuLV）、哈維鼠類肉瘤病毒（Harvey murine sarcoma virus, HaMuSV）、鼠類乳腺腫瘤病毒（MuMTV）及勞氏肉瘤病毒（Rous Sarcoma Virus, RSV）。許多其他反轉錄病毒載體可合併多個基因。所有此等載體可轉移或合併可選擇標記之基因使得經轉導之細胞可得以鑑別及產生。反轉錄病毒載體可藉由附著（例如）糖、糖脂或蛋白質而製成對靶具特異性。較佳之靶向係藉由使用抗體來實現。熟習此項技術者應瞭解，可將特定聚核苷酸序列插入反轉錄病毒基因組中或與病毒包膜連接以允許靶特異性傳遞含有 ActRIIa 聚核苷酸之反轉錄病毒載體。

或者，可由習知磷酸鈣轉染法將組織培養細胞直接用編碼反轉錄病毒結構基因 gag、pol 及 env 之質體轉染。接

著將此等細胞用含有受關注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。

ActRIIa 聚核苷酸之另一靶向傳遞系統為膠狀分散系統。膠狀分散系統包括巨分子複合物，奈米膠囊，微球體，珠粒，及包括水包油乳液、微胞、混合型微胞及脂質體之脂質基系統。本發明之較佳膠狀系統為脂質體。脂質體為適用作試管內及活體內傳遞媒劑之人工膜囊。可將 RNA、DNA 及完整病毒粒子囊封於水性內部中且以生物活性形式傳遞至細胞（參見，例如 Fraley 等人, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981）。使用脂質體媒劑進行有效基因轉移之方法在此項技術中已知，參見，例如 Mannino 等人, Biotechniques, 6:682, 1988。脂質體之組成通常為常與類固醇、尤其膽固醇組合之磷脂的組合。亦可使用其他磷脂或其他脂質。脂質體之物理特徵視 pH 值、離子強度及二價陽離子的存在而定。

適用於產生脂質體之脂質的實例包括磷脂醯化合物，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、腦甘脂及神經節苷脂。說明性磷脂包括卵磷脂醯膽鹼、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼及二硬脂醯磷脂醯膽鹼。脂質體之靶向亦有可能基於（例如）器官特異性、細胞特異性及細胞器特異性且在此項技術中已知。

#### 實施例

本發明現正加以一般性描述，藉由參考以下實施例將更易於理解本發明，該等實施例僅出於說明本發明之某些

方面及具體實例之目的而包括在內且並不意欲限制本發明。

實施例 1：ActRIIa-Fc 融合蛋白

申請者構築具有以兩者之間的最小連接子與人類或小鼠 Fc 域融合之人類 ActRIIa 胞外域的可溶性 ActRIIa 融合蛋白。該等構築體分別稱作 ActRIIa-hFc 及 ActRIIa-mFc。

ActRIIa-hFc 係於下文展示為自 CHO 細胞系純化 (SEQ ID NO: 7)：

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKR  
 RHC FATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP  
 EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKPPTGG  
GTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ActRIIa-hFc 蛋白及 ActRIIa-mFc 蛋白在 CHO 細胞系中表現。考慮三個不同前導序列：

(i) 蜜蜂蜂毒肽 (HBML)：MKFLVNVALVFMVVYISYIYA  
 (SEQ ID NO: 8)，

(ii) 組織纖維蛋白溶酶原活化劑 (TPA)：  
 MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)，及

(iii) 原生：MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO:

10)。

所選形式使用 TPA 前導子且具有以下未經加工之胺基酸序列：

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLF  
FNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIE  
IVKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNE  
KFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPVPPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK ( SEQ ID NO: 13 )

此多肽係由以下核酸序列編碼：

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTG  
CTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTA  
TACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTTTTAAT  
GCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTT  
GAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGT  
TTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAATAGT  
GAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA  
CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGT  
ATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAA  
GTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACT

TCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGGA  
 ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTG  
 GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAG  
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG  
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG  
 GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA  
 AGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC  
 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC  
 CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT  
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC  
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT  
 TCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT  
 GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG  
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC  
 TGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 14)

ActRIIa-hFc 與 ActRIIa-mFc 均顯著順應於重組性表現。如圖 1 所示，蛋白質係純化成單一、充分界定之蛋白質峰。N 末端定序揭示單一序列 ILGRSTQE (SEQ ID NO: 11)。純化可由一系列管柱層析步驟達成，該等步驟包括（例如）以任何次序進行之以下各者中之三者或三者以

上：蛋白質 A 層析、Q 瓊脂糖層析、苯基瓊脂糖層析、尺寸排阻層析及陽離子交換層析。純化可以病毒過濾及緩衝液交換來完成。ActRIIa-hFc 蛋白經純化至如由尺寸排阻層析所測定 >98% 且如由 SDS PAGE 所測定 >95% 之純度。

ActRIIa-hFc 及 ActRIIa-mFc 對配位體，尤其活化素 A 顯示高親和力。使用標準胺偶合程序將 GDF-11 或活化素 A (「ActA」) 固定於 Biacore CM5 晶片上。將 ActRIIa-hFc 蛋白及 ActRIIa-mFc 蛋白負載於系統上，且量測結合性。ActRIIa-hFc 以  $5 \times 10^{-12}$  之解離常數 ( $K_D$ ) 與活化素結合，且蛋白質以  $9.96 \times 10^{-9}$  之  $K_D$  與 GDF11 結合。參見圖 2。ActRIIa-mFc 類似地表現。

ActRIIa-hFc 在藥物動力學研究中極穩定。將大鼠以 1 mg/kg、3 mg/kg 或 10 mg/kg 之 ActRIIa-hFc 蛋白給藥且在 24、48、72、144 及 168 小時量測蛋白質之血漿含量。在獨立研究中，將大鼠以 1 mg/kg、10 mg/kg 或 30 mg/kg 給藥。在大鼠中，ActRIIa-hFc 具有 11-14 天之血清半衰期且兩週後藥物之循環含量相當高（對於 1 mg/kg、10 mg/kg 或 30 mg/kg 之初始投藥分別為 11  $\mu\text{g/ml}$ 、110  $\mu\text{g/ml}$  或 304  $\mu\text{g/ml}$ ）。在獼猴中，血漿半衰期實質上長於 14 天且藥物之循環含量對於 1 mg/kg、10 mg/kg 或 30 mg/kg 之初始投藥分別為 25  $\mu\text{g/ml}$ 、304  $\mu\text{g/ml}$  或 1440  $\mu\text{g/ml}$ 。

#### 實施例 2：定 ActRIIa-hFc 蛋白之特徵

使用 SEQ ID NO: 9 之組織纖維蛋白溶酶原前導序列，在自 pAID4 載體 (SV40 ori/強化子，CMV 啟動子) 穩定



轉染之 CHO-DUKX B11 細胞中表現 ActRIIa-hFc 融合蛋白。如上文實施例 1 中所述而純化之蛋白質具有 SEQ ID NO: 7 之序列。Fc 部分為如 SEQ ID NO: 7 所示之人類 IgG1 Fc 序列。唾液酸分析顯示蛋白質含有平均介於約 1.5 莫耳與 2.5 莫耳之間的唾液酸/ActRIIa-hFc 融合蛋白分子。

此經純化之蛋白質在所測試之所有動物中顯示顯著較長之血清半衰期，包括在人類患者中 25-32 天之半衰期（參見實施例 3，下文）。CHO 細胞所表現之物質對活化素 B 配位體之親和力高於對在人類 293 細胞中表現之 ActRIIa-hFc 融合蛋白所報導之彼親和力（del Re 等人, J Biol Chem. 2004 年 12 月 17 日; 279(51):53126-35）。另外，使用 tPa 前導序列提供比其他前導序列高之產量，且與以原生前導子所表現之 ActRIIa-Fc 不同，其提供高純度之 N 末端序列。使用原生前導序列產生兩個主要種類之 ActRIIa-Fc，各者具有不同 N 末端序列。

### 實施例 3：人類臨床試驗

在隨機化、雙盲、安慰劑對照之研究中將實施例 2 中所述之蛋白質投予人類患者，進行該研究以主要評估該蛋白質在健康停經後女性中之安全性。將 48 名個體隨機化成 6 組以接受單次劑量之 ActRIIa-hFc 或安慰劑（5 組活性劑:1 組安慰劑）。劑量水平處於經靜脈內（IV）0.01 至 3.0 mg/kg 及經皮下（SC）0.03 至 0.1 mg/kg 之範圍內。所有個體照此進行 120 天。若個體在研究入選之 6 個月內服用影響骨代謝之藥物，則將其排除在研究參與者之外。按各

組進行安全性評估以確定劑量之按比例放大。除藥物動力學 (PK) 分析以外，亦藉由量測骨形成及再吸收之生化標記及 FSH 含量來評估 ActRIIa-hFc 之生物活性。

無嚴重不良事件報導於此研究中。不良事件 (AE) 一般為輕度及短暫的。AE 之初步分析包括頭痛、實驗值升高、感冒症狀、嘔吐、靜脈內滲入及注射部位血腫。

ActRIIa-hFc 之 PK 分析顯示隨劑量之線性特徵及約 25-32 天之平均半衰期。ActRIIa-hFc 之曲線下面積 (AUC) 與劑量線性相關，且經皮下給藥後吸收基本上完全。此等數據指示經皮下為所需之給藥方法，此係由於其提供藥物之等效生物可用性及血清半衰期，同時避免與經靜脈內給藥之頭幾天相關之藥物血清濃度的尖峰。ActRIIa-hFc 引起骨特異性鹼性磷酸酶 (BAP) 之血清含量的快速、持續劑量依賴性增加 (其為同化骨生長之標記)，及 C 末端 1 型膠原蛋白尾肽及抗酒石酸鹽酸性磷酸酶 5b 含量劑量依賴性減小 (其為骨再吸收之標記)。諸如 PINP 之其他標記顯示非結論性結果。BAP 含量在最高藥物劑量下顯示接近飽和效應，其指示對此同化骨生物標記之半最大影響可在 0.3 mg/kg (增加範圍至 3 mg/kg) 之劑量下達成。按藥物之藥效作用與 AUC 之關係計算，EC50 為 51,465 (天數 × ng/ml)。在所測試之最高劑量水平下此等骨生物標記變化持續約 120 天。與活化素抑制一致，血清 FSH 含量亦存在劑量依賴性減小。

給予健康停經後女性之單次劑量 ActRIIa-hFc 對於所

測試之劑量水平範圍而言為安全的且具良好耐受性。PK 及藥效作用延長表明間歇性給藥對於未來研究而言將為適當的。舉例而言，可根據每月一次或按照每兩週、三週、四週、五週或六週一次之規則進行基於血清半衰期之給藥。另外，由於藥效作用延長至遠遠超過藥物之血清滯留期，因此可基於藥效作用進行給藥，其意謂每三個月或每兩個、三個、四個、五個、六個或甚至十二個月給藥可有效地在患者中產生所要作用。此臨床試驗證實，在人類中 ActRIIa-hFc 為具有骨形成增加與骨再吸收減少之生物跡象的骨同化劑。

#### 實施例 4：ActRIIa-Fc 改善或預防由乳癌轉移引起之骨質流失

據估計 65%至 75%之乳癌轉移至骨，其對骨結構產生實質性損傷，增加骨折危險且引起疼痛及其他副作用。吾人測試 ActRIIa-Fc 在已轉移至骨之乳癌之小鼠模型中的作用。

於試管內培養人類乳癌細胞系 MDA-MB-231 之亞系（純系 2287，Kang 等人 Cancer Cell 2003，第 3 卷:537-549）且以  $5 \times 10^6$  個細胞/毫升之密度收集細胞。MDA-MB-231 為在接種至骨中且引起與由骨轉移引起之骨損傷類似之骨損傷方面高度勝任之細胞系。研究第 0 天將 10  $\mu$ l 細胞注射至 6 週齡之雌性無胸腺裸鼠之脛骨中。研究第 10 天小鼠接受 ActRIIa-mFc（10mg/kg/每週兩次/經皮下）（n=8）或 PBS 媒劑（n=7）。以每週時間間隔使用雙能量

x 射線吸收測定法 (PIXIMus) 由骨礦物密度之變化來評估疾病進程。將小鼠用 ActRIIa-mFc 治療 4 週且接著將其處死，且自各動物收集脛骨 (經腫瘤注射與無腫瘤)。接著對脛骨進行處理且準備用於微電腦斷層攝影 (microCT) 及組織學分析。

將 MDA-MB-231 細胞經脛骨內注射至無胸腺裸鼠中與對側腿相比促進經注射之脛骨中之溶骨病變發展。近端脛骨之 MicroCT 分析證實，與經 PBS 媒劑治療之小鼠的無腫瘤脛骨相比，負載 MDA-MB-231 脛骨之疏質骨體積減小 62%。ActRIIa-mFc 治療使得與媒劑相比，原生脛骨或負載腫瘤脛骨分別增加 70% 或 147% (對二者而言， $P < 0.01$ )。經 ActRIIa-mFc 治療之小鼠的負載腫瘤脛骨具有與經 VEH 治療之小鼠的原生脛骨類似之疏質骨密度 ( $p = 0.39$ )。

因此，ActRIIa-mFc 能消除與骨中乳腺腫瘤細胞的存在相關之骨損傷。

#### 實施例 5：ActRIIa-Fc 減少乳癌轉移且促進存活

作為轉移性疾病之模型，可藉由心內注射將 MDA-MB-231 細胞引入小鼠中。注射至左心室中之細胞將經血流遷移且在遠端部位處形成轉移性病變。衍生細胞系 MDA-MB-231-luc-D3H2LN (Caliper Life Sciences) 為允許使用生物光子成像技術 (Caliper Life Sciences) 非侵襲性監測轉移性腫瘤形成之螢光素酶表現細胞系。此模型用於評估 ActRIIa-mFc 減少轉移性乳癌病變形成之潛力。

藉由心內注射至 26 隻無胸腺裸鼠中來引入 MDA-MB-

231-luc-D3H2LN 細胞。在腫瘤投予之前兩週開始且持續貫穿整個研究過程，將小鼠中之 14 隻用媒劑（磷酸鹽緩衝生理食鹽水-PBS）治療且 12 隻用 ActRIIa-mFc（10 mg/kg，每週兩次，經皮下注射）治療。將額外 9 隻小鼠用細胞模擬注射且用 ActRIIa-mFc 治療。將小鼠週期性麻醉且針對生物發光來觀測以偵測轉移性進程的形成。

ActRIIa-mFc 治療組顯示轉移性病變之發展實質上減少。至第 5 週為止，14 隻經媒劑治療之小鼠中 12 隻顯示指示轉移性擴散之多個強螢光信號，而 12 隻經 ActRIIa-mFc 治療之小鼠中僅 4 隻顯示類似病變（圖 3）。螢光強度之定量顯示在經治療之小鼠中螢光信號減小約 10 倍。

此外，ActRIIa-mFc 治療顯著增加小鼠存活。至研究第 40 天為止，所有（14/14）經媒劑治療之小鼠已死亡或已施以無痛致死術（根據研究動物之人類處理的標準程序），而經 ActRIIa-mFc 治療之小鼠中僅兩隻（2/12）已死亡或已施以無痛致死術。至第 45 天為止，12 隻經 ActRIIa-mFc 治療之小鼠中 3 隻已死亡或已施以無痛致死術，且模擬注射之小鼠中無一者已死亡。

因此，在此轉移性乳癌模型中，ActRIIa-mFc 治療使得轉移性病變的形成實質性減少且促進存活。此等資料指示 ActRIIa-Fc 可用於（尤其）與靶向原發性腫瘤之療法（諸如手術、激素療法或傳統化學療法）結合來治療人類患者之乳癌。

#### 實施例 6：替代 ActRIIa-Fc 蛋白

可根據本文所述之方法使用之多種 ActRIIa 變體描述於以 WO2006/012627 公開之國際專利申請案（參見，例如第 55-60 頁）中，該申請案以引用的方式全部併入本文中。替代構築體可缺失 ActRIIa 之胞外域之 C 末端尾巴（最後 15 個胺基酸）。該構築體之序列呈現如下（Fc 部分加下劃線）（SEQ ID NO: 12）：

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKR  
 RHC FATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSP  
 EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK

以引用方式併入

本文所提及之所有公開案及專利藉此以引用的方式全部併入，如同每一個別公開案或專利特定及個別地表示以引用的方式併入一般。若有衝突，本申請案（包括本文之任何定義）將起控制作用。

儘管已討論標的物之特定具體實例，但上述說明為說明性的且並非限制性的。對本說明書及以下申請專利範圍的回顧之後，許多變化對於熟習此項技術者而言將變得顯而易見。本發明之完整範疇應藉由參考申請專利範圍連同

其等效物之完整範疇一起及本說明書連同該等變化一起而確定。

**【圖式簡單說明】**

圖 1 展示於 CHO 細胞中表現之 ActRIIa-hFc 之純化。如由分級柱(左畫面)及庫馬斯(Coomassie)染色 SDS-PAGE (右畫面) (左道：分子量標準；右道：ActRIIa-hFc) 所觀測，蛋白質純化成單一、充分界定之峰。

圖 2 展示如由 BiaCore™ 檢定所量測，ActRIIa-hFc 與活化素及 GDF-11 之結合。

圖 3 展示 ActRIIa-mFc 治療大大減少轉移性乳癌之小鼠模型中之轉移性病變形成。心內注射表現 MDA-MB-231 乳癌細胞之螢光素酶之後五週非侵襲性地(經麻醉、螢光成像)觀測小鼠。14 隻經媒劑治療之小鼠中 12 隻顯示明顯轉移性病變，而 12 隻經 ActRIIa-mFc 治療之小鼠中僅 4 隻顯示明顯病變。

**【主要元件符號說明】**

(無)

**五、中文發明摘要：**

在某些方面中，本發明提供治療或預防人類之乳癌的組合物及方法。

**六、英文發明摘要：**

In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for treating or preventing breast cancer in humans.



## 十、申請專利範圍：

1.一種 ActRIIa-Fc 融合蛋白之用途，其係用於製造供治療或預防人類患者乳癌或乳癌相關骨質流失用之醫藥品。

2.如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白係選自由以下各者組成之群：

a.包含與 SEQ ID NO: 2 至少 90%一致之胺基酸序列的多肽；

b.包含與 SEQ ID NO: 3 至少 90%一致之胺基酸序列的多肽；及

c.包含 SEQ ID NO: 2 之至少 50 個連續胺基酸的多肽。

3.如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有以下特徵中之一或多者：

i.以至少  $10^{-7}$  M 之  $K_D$  與 ActRIIa 配位體結合；及

ii.抑制細胞中之 ActRIIa 信號轉導。

4.如申請專利範圍第 3 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包括一或多個選自以下各者之經修飾胺基酸殘基：糖基化胺基酸、PEG 化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、經結合生物素之胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸，及與有機衍生劑結合之胺基酸。

5.如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含與 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列至少 90%一致之胺基酸序列。

6.如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc

融合蛋白包含與 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列至少 95%一致之胺基酸序列。

7.如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

8.如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列。

9.如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白為由兩個各自包含與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列至少 90%一致之胺基酸序列的多肽形成之二聚體且其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含三個或三個以上唾液酸部分。

10.如申請專利範圍第 9 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列。

11.如申請專利範圍第 10 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含介於 3 個與 5 個之間的唾液酸部分。

12.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該醫藥品在投予該患者後使得該患者之骨骼肌質量增加小於 10%。

13.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白經投予該人類患者以在該患者中達到至少 0.2 mg/kg 之血清濃度。

14.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列。

15.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白在正常、健康人中具有介於 15 天與 40 天之間的血清半衰期。

16.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白投予該患者之頻率不高於每週一次。

17.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白投予該患者之頻率不高於每月一次。

18.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該 ActRIIa-Fc 融合蛋白投予該患者之頻率不高於每三個月一次。

19.如申請專利範圍第 1 項至第 18 項中任一項之用途，其中該患者正接受骨骼抗再吸收療法或在投予 ActRIIa-Fc 融合蛋白前一年內已接受骨骼抗再吸收療法。

20.如申請專利範圍第 19 項之用途，其中該抗再吸收劑係選自由以下各者組成之群：雙膦酸鹽藥劑、RANK 配位體拮抗劑及護骨素（osteoprotegrin）拮抗劑。

21.如申請專利範圍第 1 項至第 18 項中任一項之用途，其中該醫藥品係與放射線療法、內分泌療法或細胞毒性劑組合施予該人類患者。

22.如申請專利範圍第 1 項至第 18 項中任一項之用途，其中該人類患者為具有一或多個乳癌危險因子之女性。

23.一種活化素-ActRIIa 拮抗劑之用途，其係用於製造供治療或預防個體乳癌或乳癌相關骨質流失用之醫藥品。

24.如申請專利範圍第 23 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑為活化素或 ActRIIa 拮抗劑多肽。

25.如申請專利範圍第 24 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑為選自由以下各者組成之群的抗體：

a.抗活化素抗體；及

b. 抗 ActRIIa 抗體。

26. 如申請專利範圍第 25 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑之投藥使得乳癌之發作延緩，抑制乳癌之進程，延緩轉移之發作，或減小腫瘤尺寸。

27. 如申請專利範圍第 23 項之用途，其中該個體為人類。

28. 如申請專利範圍第 27 項之用途，其中該人類為具有一或多個乳癌危險因子之女性。

29. 如申請專利範圍第 23 項之用途，其中該醫藥品係與放射線療法、內分泌療法或細胞毒性劑組合施予該個體。

30. 一種鑑別適用於治療或預防乳癌之藥劑之方法，該方法包含：

a. 鑑別與 ActRIIa 配位體競爭性地結合 ActRIIa 多肽之配位體結合域之測試藥劑；及

b. 評估該藥劑對乳癌細胞增殖或存活之影響。

31. 一種活化素-ActRIIa 拮抗劑之用途，其係用於製造供抑制患有乳癌之人類患者中活化素介導之信號轉導用的醫藥品。

32. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑為活化素或 ActRIIa 拮抗劑多肽。

33. 如申請專利範圍第 32 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑為活化素或 ActRIIa 拮抗劑多肽。

34. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該活化素-

ActRIIa 拮抗劑為選自由以下各者組成之群的抗體：

- a. 抗活化素抗體；及
- b. 抗 ActRIIa 抗體。

35. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑多肽係選自由以下各者組成之群：

- a. 包含與 SEQ ID NO: 2 至少 90% 一致之胺基酸序列的多肽；
- b. 包含與 SEQ ID NO: 3 至少 90% 一致之胺基酸序列的多肽；及
- c. 包含選自 SEQ ID NO: 2 之至少 50 個連續胺基酸的多肽。

36. 如申請專利範圍第 31 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑多肽具有以下特徵中之一或多者：

- i. 以至少  $10^{-7}$  M 之  $K_D$  與 ActRIIa 配位體結合；及
- ii. 抑制細胞中之 ActRIIa 信號轉導。

37. 如申請專利範圍第 35 項之用途，其中該活化素-ActRIIa 拮抗劑多肽為除 ActRIIa 多肽域以外包括一或多個增強活體內穩定性、活體內半衰期、吸收/投藥、組織定位或分布、蛋白質複合物形成、及/或純化中之一或多者之多肽部分的融合蛋白。

38. 如申請專利範圍第 37 項之用途，其中該融合蛋白包括選自由以下各者組成之群的多肽部分：免疫球蛋白 Fc 域及血清白蛋白。

39. 如申請專利範圍第 37 項之用途，其中該活化素-

ActRIIa 拮抗劑多肽包括一或多個選自以下各者之經修飾胺基酸殘基：糖基化胺基酸、PEG 化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、經結合生物素之胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸，及與有機衍生劑結合之胺基酸。

### 十一、圖式：

如次頁。

ActRIIa 拮抗劑多肽包括一或多個選自以下各者之經修飾胺基酸殘基：糖基化胺基酸、PEG 化胺基酸、法呢基化胺基酸、乙醯化胺基酸、經結合生物素之胺基酸、與脂質部分結合之胺基酸，及與有機衍生劑結合之胺基酸。

### 十一、圖式：

如次頁。

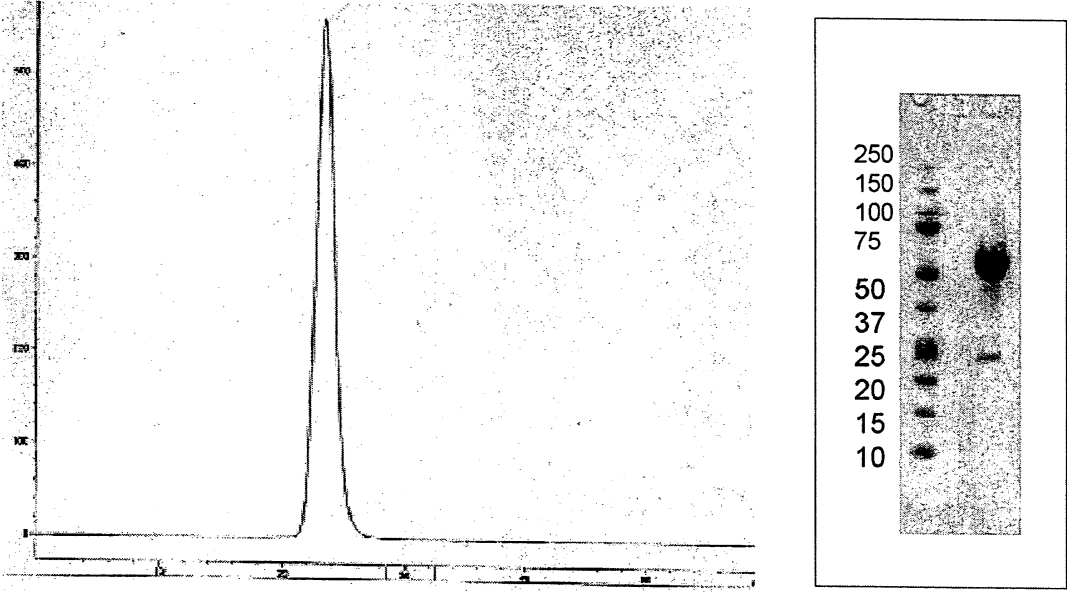


圖1



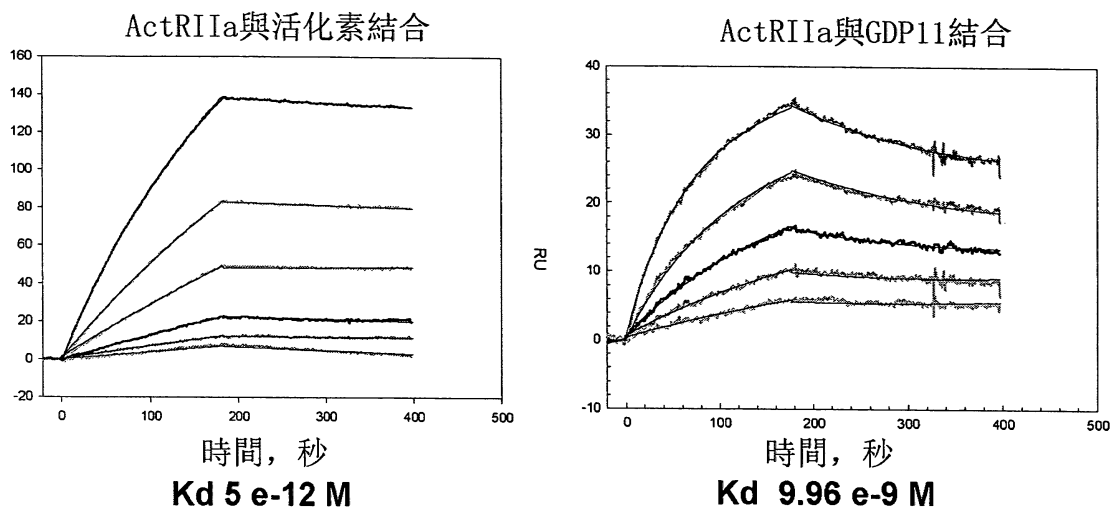


圖2

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 3 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(無)