



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105431455 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201480020307. 6

代理人 陈文平 徐志明

(22) 申请日 2014. 02. 03

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/759, 961 2013. 02. 01 US

61/815, 220 2013. 04. 23 US

C07K 16/26(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

A61K 31/395(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/014490 2014. 02. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/121221 EN 2014. 08. 07

(71) 申请人 圣塔玛丽亚生物疗法公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 安姆根公司

(72) 发明人 韩汇泉 C·M·哈奎 I·切哈诺沃

周小岚 J·Z-n·卢

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

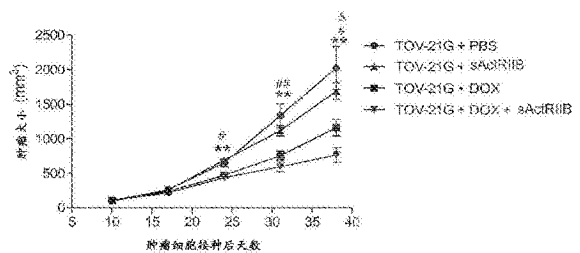
权利要求书8页 说明书103页 附图52页

(54) 发明名称

抗激活素 A 化合物对受试者的施用

(57) 摘要

本发明涉及通过将抗激活素 A 化合物 (如抗激活素 A 抗体或激活素 A 结合受体) 施用于受试者来治疗受试者卵巢癌的方法, 其中通过评价受试者的特定生物标志物或血管生成的表达水平。在一些实施方案中, 将至少两种化合物施用于受试者, 其中第一种化合物是抗激活素 A 化合物, 和第二种化合物是化疗化合物, 例如卡培他滨。本发明进一步涉及针对治疗因素鉴别受试者的方法。



1. 一种治疗受试者卵巢癌的方法,包括:

施用治疗有效量的至少两种化合物:

第一种化合物和第二种化合物,其中所述第一种化合物是抗激活素 A 化合物,和其中所述第二种化合物是化疗化合物。

2. 权利要求 1 的方法,其中用药物学上可接受的载体配制所述至少两种化合物中的一种或多种。

3. 权利要求 1 的方法,其中在施用所述第一种化合物后施用所述第二种化合物。

4. 权利要求 1 的方法,其中在施用所述第二种化合物后施用所述第一种化合物。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述第一种化合物和所述第二种化合物同时施用。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物包含:

(a) 轻链 CDR3,其包含选自以下的序列:

i. 与选自本文中公开的轻链 CDR3 序列的 CDR3 序列相差总共不超过两个氨基酸添加、置换和 / 或删除的轻链 CDR3 序列,和;

ii.  $X_{73}QX_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$  (SEQ ID NO:132);

iii.  $LQHNX_{81}YX_{82}X_{83}T$  (SEQ ID NO:131);和

iv.  $QAWDX_{84}STX_{85}X_{86}$  (SEQ ID NO:248);

其中  $X_{73}$  是甲硫氨酸残基、谷氨酰胺残基或精氨酸残基,  $X_{74}$  是丙氨酸残基、酪氨酸残基、谷氨酰胺残基或丝氨酸残基,  $X_{75}$  是亮氨酸残基、酪氨酸残基或天冬酰胺残基,  $X_{76}$  是谷氨酰胺残基、丝氨酸残基或苏氨酸残基,  $X_{77}$  是苏氨酸残基、酪氨酸残基或异亮氨酸残基,  $X_{78}$  是脯氨酸残基或丝氨酸残基,  $X_{79}$  是半胱氨酸残基、色氨酸残基、亮氨酸残基或脯氨酸残基,  $X_{80}$  是丝氨酸残基或苏氨酸残基,  $X_{81}$  是苏氨酸残基或丝氨酸残基,  $X_{82}$  是脯氨酸残基或苏氨酸残基,  $X_{83}$  是苯丙氨酸残基或色氨酸残基,  $X_{84}$  是精氨酸残基或丝氨酸残基,  $X_{85}$  是缬氨酸残基或丙氨酸残基,以及  $X_{86}$  是缬氨酸残基或无残基,并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A;或

(b) 重链 CDR3,其包含选自以下的序列:

i. 与选自本文中公开的重链 CDR3 序列的 CDR3 序列相差总共不超过三个氨基酸添加、置换和 / 或删除的重链 CDR3 序列;

ii.  $X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}FDY$  (SEQ ID NO:187);

iii.  $X_{95}X_{96}X_{97}YX_{98}DX_{99}X_{100}GWX_{101}X_{102}X_{103}$  (SEQ ID NO:188);和

iv.  $X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}YX_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$  (SEQ ID NO:249)

其中  $X_{87}$  是缬氨酸残基或无残基,  $X_{88}$  是谷氨酰胺残基或无残基,  $X_{89}$  是天冬氨酸残基、色氨酸残基或无残基,  $X_{90}$  是丝氨酸残基、亮氨酸残基或无残基,  $X_{91}$  是异亮氨酸残基、谷氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{92}$  是丙氨酸残基、亮氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{93}$  是丙氨酸残基或亮氨酸残基,  $X_{94}$  是脯氨酸残基、酪氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{95}$  是天冬氨酸残基或无残基,  $X_{96}$  是谷氨酰胺残基或无残基,  $X_{97}$  是天冬氨酸残基或丙氨酸残基,  $X_{98}$  是酪氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{99}$  是丝氨酸残基或酪氨酸残基,  $X_{100}$  是丝氨酸残基或精氨酸残基,  $X_{101}$  是苯丙氨酸残基或无残基,  $X_{102}$  是甘氨酸残基或天冬氨酸残基,  $X_{103}$  是组氨酸残基或脯氨酸残基,  $X_{104}$  是甘氨酸残基或无残基,  $X_{105}$  是丝氨酸残基、谷氨酸残基或无残基,  $X_{106}$  是精氨酸残基、丝氨酸残基或无残基,  $X_{107}$  是天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、丝氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{108}$  是丝氨酸残基、

精氨酸残基或色氨酸残基,  $X_{109}$ 是甘氨酸残基、天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或亮氨酸残基,  $X_{110}$ 是丝氨酸残基、甘氨酸残基、天冬氨酸残基或无残基,  $X_{111}$ 是丝氨酸残基、缬氨酸残基、天冬酰胺残基或酪氨酸残基,  $X_{112}$ 是丝氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或组氨酸残基,  $X_{113}$ 是色氨酸残基、酪氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{114}$ 是组氨酸残基、天冬氨酸残基、酪氨酸残基或无残基,  $X_{115}$ 是苯丙氨酸残基、丙氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{116}$ 是天冬氨酸残基、苯丙氨酸残基、亮氨酸残基或甲硫氨酸残基,  $X_{117}$ 是酪氨酸残基或天冬氨酸残基,  $X_{118}$ 是异亮氨酸残基、缬氨酸残基或无残基, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A ;或

(c) (a) 的轻链 CDR3 序列和 (b) 的重链 CDR3 序列, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述抗激活素 A 化合物进一步包含 :

(d) 轻链可变结构域, 其包含 : i. 本文中公开的轻链 CDR1 序列 ; ii. 本文中公开的轻链 CDR2 序列 ; 和 iii. 本文中公开的轻链 CDR3 序列 ; 或

(e) 重链可变结构域, 其包含 : i. 本文中公开的重链 CDR1 序列 ; ii. 本文中公开的重链 CDR2 序列 ; 和 iii. 本文中公开的重链 CDR3 序列 ; 或

(f) (d) 的轻链可变结构域和 (e) 的重链可变结构域。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗激活素 A 化合物包含 :

(a) 轻链可变结构域序列, 其选自 : i. 与本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列至少 80% 相同的氨基酸序列 ; ii. 通过与编码本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列的多核苷酸序列至少 80% 相同的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 和 iii. 通过在中等严格条件下与本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列组成的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 或

(b) 重链可变结构域序列, 其选自 : i. 与本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列至少 80% 相同的氨基酸序列 ; ii. 通过与编码本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列的多核苷酸序列至少 80% 相同的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 和 iii. 通过在中等严格条件下与本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列组成的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 或

(c) (a) 的轻链可变结构域和 (b) 的重链可变结构域 ;

其中所述抗原结合蛋白结合人激活素 A。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述抗激活素 A 化合物进一步包含 :

(d) 选自本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列 ; 或

(e) 选自本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列 ; 或

(f) (d) 的轻链可变结构域和 (e) 的重链可变结构域。

10. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗激活素 A 化合物包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB), 其中所述多肽选自 :

(a) 包含 SEQ ID NO:2 中所示序列的变体的多肽, 其中所述变体序列包括位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换, 其中位置 28 的置换选自 W 和 Y, 和位置 44 的置换是 T ;

(b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 19 至 134 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T;

(c) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 23 至 134 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T;

(d) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 25 至 134 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T;和

(e) 与 (a) 至 (d) 任一个具有至少 80% 序列同一性的多肽,其中所述序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

11. 权利要求 1 的方法,其中抗激活素 A 化合物包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB),其中所述多肽选自:

(a) 由 SEQ ID NO:4、6、12 和 14 所示序列组成的多肽;

(b) 与 (a) 具有至少 90% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,且在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11,和

(c) 与 (a) 具有至少 95% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,且在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述多肽可操作地连接至少一个异源多肽。

13. 权利要求 11 的方法,其中所述多肽在位置 64 包含丙氨酸残基。

14. 权利要求 12 的方法,其中所述异源多肽包括 IgG Fc 结构域。

15. 权利要求 12 的方法,其中所述异源多肽通过接头序列可操作地连接抗激活素 A 化合物。

16. 权利要求 15 的方法,其中接头选自:SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50。

17. 权利要求 14 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物包括选自以下的多肽:

(a) 由 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 的组中所示序列组成的多肽;

(b) 与 (a) 具有至少 90% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,和在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11,和

(c) 与 (a) 具有至少 95% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,和在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述化疗化合物是卡培他滨。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述化疗化合物是阿霉素脂质复合物。

20. 权利要求 1 的方法,其中所述卵巢癌是浆液性卵巢癌。

21. 权利要求 20 的方法,进一步包括:通过检测与对照相比或与受试者之前的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的水平相比,受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的升高的水平来鉴别所述受试者。



22. 权利要求 20 的方法,进一步包括:

通过包括以下步骤的方法来鉴别所述受试者:

评价所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平;

将所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阴性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平进行比较;和

确定所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 因子的表达水平超过所述阴性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。

23. 权利要求 20 的方法,进一步包括:

通过包括以下步骤的方法来鉴别所述受试者:

评价所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平;

将所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阳性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平进行比较;和

确定所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 因子的表达水平符合或超过所述阳性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述卵巢癌是透明细胞卵巢癌、颗粒细胞卵巢癌、莱迪希细胞肿瘤或性索基质睾丸肿瘤。

25. 权利要求 1 的方法,其中所述卵巢癌是透明细胞卵巢癌。

26. 权利要求 24 的方法,进一步包括:通过检测与对照比较,受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 的升高的水平来鉴别所述受试者。

27. 权利要求 24 的方法,进一步包括:

通过包括以下步骤的方法来鉴别所述受试者:

评价所述受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平;

将所述受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平与阴性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平进行比较;和

确定所述受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平超过所述阴性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平。

28. 权利要求 24 的方法,进一步包括:

通过包括以下步骤的方法来鉴别所述受试者:

评价所述受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平;

将所述受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平与阳性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平进行比较;和

确定所述受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平符合或超过所述阳性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平。

29. 权利要求 1 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物皮下、静脉内或腹膜内施用于受试者。

30. 权利要求 1 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物以至少 0.5mg/kg 的剂量施用于受试者,一周一次。

31. 权利要求 1 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物皮下、静脉内或腹膜内施用于受试者。

32. 权利要求 1 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物以至少 0.5mg/kg 或更大的剂量施用于受试者,一周一次。

33. 权利要求 18 的方法,其中所述卡培他滨皮下、静脉内或腹膜内施用于受试者。

34. 权利要求 18 的方法,其中所述卡培他滨通过口服施用于受试者。

35. 权利要求 18 的方法,其中所述卡培他滨以 1250mg/m<sup>2</sup>的剂量施用于受试者,一天两次,持续两周。

36. 权利要求 35 的方法,其中在卡培他滨施用两周后,存在一周的休息期。

37. 权利要求 19 的方法,其中所述阿霉素脂质复合物皮下、静脉内或腹膜内施用于受试者。

38. 权利要求 19 的方法,其中所述阿霉素脂质复合物以 40mg/m<sup>2</sup>IV 的剂量施用于受试者,每四周一次。

39. 一种用于治疗需要的受试者的浆液性卵巢癌的方法,包括将治疗有效量的抗激活素 A 化合物施用于所述受试者。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB),其中所述多肽选自:

(a) 由 SEQ ID NO:4、6、12 和 14 中所示序列组成的多肽;

(b) 与 (a) 具有至少 90% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,和在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11,和

(c) 与 (a) 具有至少 95% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,和在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

41. 权利要求 39 的方法,其中所述化合物用药物学上可接受的载体来配制。

42. 权利要求 39 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物包含:

(a) 轻链 CDR3,其包含选自以下的序列:

i. 与选自本文中公开的轻链 CDR3 序列的 CDR3 序列相差总共不超过两个氨基酸添加、置换和 / 或删除的轻链 CDR3 序列,和;

ii. X<sub>73</sub>QX<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub>X<sub>80</sub> (SEQ ID NO:132);

iii. LQHNX<sub>81</sub>YX<sub>82</sub>X<sub>83</sub>T (SEQ ID NO:131);和

iv. QAWDX<sub>84</sub>STX<sub>85</sub>X<sub>86</sub> (SEQ ID NO:248);

其中 X<sub>73</sub>是甲硫氨酸残基、谷氨酰胺残基或精氨酸残基, X<sub>74</sub>是丙氨酸残基、酪氨酸残基、谷氨酰胺残基或丝氨酸残基, X<sub>75</sub>是亮氨酸残基、酪氨酸残基或天冬酰胺残基, X<sub>76</sub>是谷氨酰胺残基、丝氨酸残基或苏氨酸残基, X<sub>77</sub>是苏氨酸残基、酪氨酸残基或异亮氨酸残基, X<sub>78</sub>是脯氨酸残基或丝氨酸残基, X<sub>79</sub>是半胱氨酸残基、色氨酸残基、亮氨酸残基或脯氨酸残基, X<sub>80</sub>是丝氨酸残基或苏氨酸残基, X<sub>81</sub>是苏氨酸残基或丝氨酸残基, X<sub>82</sub>是脯氨酸残基或苏氨酸残基, X<sub>83</sub>是苯丙氨酸残基或色氨酸残基, X<sub>84</sub>是精氨酸残基或丝氨酸残基, X<sub>85</sub>是缬氨酸残基或丙氨酸残基,以及 X<sub>86</sub>是缬氨酸残基或无残基,并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A ;或

(b) 重链 CDR3,其包含选自以下的序列:

i. 与选自本文中公开的重链 CDR3 序列的 CDR3 序列相差总共不超过三个氨基酸添加、置换和 / 或删除的重链 CDR3 序列;

- ii.  $X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ FDY (SEQ ID NO:187) ;  
 iii.  $X_{95}X_{96}X_{97}YX_{98}DX_{99}X_{100}GWX_{101}X_{102}X_{103}$  (SEQ ID NO:188) ;和  
 iv.  $X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}YX_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$  (SEQ ID NO:249)

其中  $X_{87}$  是缬氨酸残基或无残基,  $X_{88}$  是谷氨酰胺残基或无残基,  $X_{89}$  是天冬氨酸残基、色氨酸残基或无残基,  $X_{90}$  是丝氨酸残基、亮氨酸残基或无残基,  $X_{91}$  是异亮氨酸残基、谷氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{92}$  是丙氨酸残基、亮氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{93}$  是丙氨酸残基或亮氨酸残基,  $X_{94}$  是脯氨酸残基、酪氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{95}$  是天冬氨酸残基或无残基,  $X_{96}$  是谷氨酰胺残基或无残基,  $X_{97}$  是天冬氨酸残基或丙氨酸残基,  $X_{98}$  是酪氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{99}$  是丝氨酸残基或酪氨酸残基,  $X_{100}$  是丝氨酸残基或精氨酸残基,  $X_{101}$  是苯丙氨酸残基或无残基,  $X_{102}$  是甘氨酸残基或天冬氨酸残基,  $X_{103}$  是组氨酸残基或脯氨酸残基,  $X_{104}$  是甘氨酸残基或无残基,  $X_{105}$  是丝氨酸残基、谷氨酸残基或无残基,  $X_{106}$  是精氨酸、丝氨酸或无残基,  $X_{107}$  是天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、丝氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{108}$  是丝氨酸残基、精氨酸残基或色氨酸残基,  $X_{109}$  是甘氨酸残基、天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或亮氨酸残基,  $X_{110}$  是丝氨酸残基、甘氨酸残基、天冬氨酸残基或无残基,  $X_{111}$  是丝氨酸残基、缬氨酸残基、天冬酰胺残基或酪氨酸残基,  $X_{112}$  是丝氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或组氨酸残基,  $X_{113}$  是色氨酸残基、酪氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{114}$  是组氨酸残基、天冬氨酸残基、酪氨酸残基或无残基,  $X_{115}$  是苯丙氨酸残基、丙氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{116}$  是天冬氨酸残基、苯丙氨酸残基、亮氨酸残基或甲硫氨酸残基,  $X_{117}$  是酪氨酸残基或天冬氨酸残基,  $X_{118}$  是异亮氨酸残基、缬氨酸残基或无残基, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A ;或

(c) (a) 的轻链 CDR3 序列和 (b) 的重链 CDR3 序列, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A。

43. 权利要求 42 的方法, 其中所述抗激活素 A 化合物进一步包含 :

(d) 轻链可变结构域, 其包含 : i. 本文中公开的轻链 CDR1 序列 ; ii. 本文中公开的轻链 CDR2 序列 ; 和 iii. 本文中公开的轻链 CDR3 序列 ; 或

(e) 重链可变结构域, 其包含 : i. 本文中公开的重链 CDR1 序列 ; ii. 本文中公开的重链 CDR2 序列 ; 和 iii. 本文中公开的重链 CDR3 序列 ; 或

(f) (d) 的轻链可变结构域和 (e) 的重链可变结构域。

44. 权利要求 39 的方法, 其中所述抗激活素 A 化合物包含 :

(a) 轻链可变结构域序列, 其选自 : i. 与本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列至少 80% 相同的氨基酸序列 ; ii. 通过与编码本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列的多核苷酸序列至少 80% 相同的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 和 iii. 通过在中等严格条件下与本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列组成的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 或

(b) 重链可变结构域序列, 其选自 : i. 与本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列至少 80% 相同的氨基酸序列 ; ii. 通过与编码本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列的多核苷酸序列至少 80% 相同的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 和 iii. 通过在中等严格条件下与本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列组成的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编

码的氨基酸序列 ;或

(c) (a) 的轻链可变结构域和 (b) 的重链可变结构域 ;其中所述抗原结合蛋白结合人激活素 A。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物进一步包含 :

(d) 选自本文中公开的轻链可变结构域序列的轻链可变结构域序列 ;或

(e) 选自本文中公开的重链可变结构域序列的重链可变结构域序列 ;或

(f) (d) 的轻链可变结构域和 (e) 的重链可变结构域。

46. 权利要求 39 方法,其中所述抗激活素 A 化合物包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB),其中所述多肽选自 :

(a) 包含 SEQ ID NO:2 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T ;

(b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 19 至 134 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T ;

(c) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 23 至 134 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T ;

(d) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 25 至 134 中所示序列的变体的多肽,其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T ;和

(e) 与 (a) 至 (d) 任一个具有至少 80% 序列同一性的多肽,其中所述序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换,其中位置 28 的置换选自 W 和 Y,和位置 44 的置换是 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

47. 权利要求 40 的方法,其中所述多肽可操作地连接至少一个异源多肽。

48. 权利要求 40 的方法,其中所述多肽包含位置 64 的丙氨酸残基。

49. 权利要求 47 的方法,其中所述异源多肽包括 IgG Fc 结构域。

50. 权利要求 47 的方法,其中所述异源多肽通过接头序列可操作地连接所述抗激活素 A 化合物。

51. 权利要求 50 的方法,其中所述接头选自 :SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50。

52. 权利要求 49 的方法,其中所述抗激活素 A 化合物包括选自以下的多肽 :

(d) 由 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 的组中所示序列组成的多肽 ;

(e) 与 (d) 具有至少 90% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,和在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11,和

(f) 与 (d) 具有至少 95% 序列同一性的多肽,其中所述多肽在位置 28 具有 W 或 Y,和在位置 44 具有 T,其中所述多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

53. 权利要求 39 的方法,进一步包括 :通过检测与对照相比,受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的升高的水平来鉴别所述受试者。

54. 权利要求 39 的方法,进一步包括:

通过包括以下步骤的方法来鉴别所述受试者:

评价所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平;

将所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阴性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平进行比较;和

确定所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 因子的表达水平超过所述阴性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。

55. 权利要求 39 的方法,进一步包括:

通过包括以下步骤的方法来鉴别所述受试者:

评价所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平;

将所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阳性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平进行比较;和

确定所述受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 因子的表达水平符合或超过所述阳性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。

56. 权利要求 39 的方法,其中所述受试者具有突变的激活素基因或突变的激活素反调节剂基因。

57. 权利要求 40 的方法,其中所述受试者具有突变的激活素基因或突变的激活素反调节剂基因。

58. 权利要求 56 的方法,其中所述受试者具有突变的激活素基因,和其中所述突变是 Asn386Ser 突变、Arg60Leu 突变或 Gly280Glu 突变。

59. 权利要求 57 的方法,其中所述受试者具有突变的激活素基因,和其中所述突变是 Asn386Ser 突变、Arg60Leu 突变或 Gly280Glu 突变。

## 抗激活素 A 化合物对受试者的施用

### [0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2013 年 2 月 1 日提交的美国临时申请 No. 61/759, 961 和 2013 年 4 月 23 日提交的美国临时申请 No. 61/815, 220 的权益。将这些申请的全部教导按引用并入本文中用于所有目的。

[0003] 本申请还涉及：2009 年 11 月 25 日提交的美国申请 No. 12/626, 375；2011 年 4 月 5 日提交的美国申请 No. 13/080, 515；2011 年 12 月 19 日提交的美国申请 No. 13/329, 897；2012 年 7 月 16 日提交的美国申请 No. 13/550, 447；2007 年 9 月 7 日提交的美国专利 No. 8, 309, 082；2008 年 3 月 5 日提交的美国专利 No. 7, 947, 646；2007 年 9 月 7 日提交的 PCT 申请 No. WO 2008/031061；2008 年 3 月 6 日提交的 PCT 申请 No. WO 2008/109167 和 2009 年 11 月 25 日提交的 PCT 申请 No. WO 2010/062383, 其全部按引用全文并入本文中。

### [0004] 序列表的引用

[0005] 本申请包括作为 ASXII 文本文件电子提交的序列列表。将序列列表按引用并入。序列列表中所示的 SEQ ID NO 识别号应当被忽视。2014 年 1 月 31 日形成的所述 ASII 副本命名为 25885PCT\_CRF\_sequencelisting.txt 并且大小为 218, 613 字节。

## 背景技术

[0006] 激活素 A 是最初在性腺液中鉴别的 TGF- $\beta$  家族的成员。其通过控制促卵泡激素 (FSH) 从脑垂体的释放在调节月经周期中起着重要作用。还知道激活素 A 起着多样的其他作用, 如在细胞生长和分化、免疫应答和伤口愈合中的作用。

[0007] 卵巢癌是所有妇科癌症中最致命的。在美国, 大约每 60 名女性中就有一名发生卵巢癌, 并且每年诊断出超过 25, 000 个新病例。低于 25% 的卵巢癌病例能在癌症扩散到卵巢外之前被诊断出来, 并且晚期卵巢癌的五年存活率低于 30%。

## 发明内容

[0008] 本文中公开了通过将抗激活素 A 化合物施用于受试者来治疗受试者的卵巢癌的方法, 包括抗激活素 A 抗体和 / 或激活素受体。还公开了通过评估受试者中特定蛋白质的水平来鉴别用于卵巢癌治疗的受试者的方法。

[0009] 在一个实施方案中, 所述方法包括将治疗有效量的抗激活素 A 化合物施用于受试者。在另一个实施方案中, 用药物学上可接受的载体配制抗激活素 A 化合物。

[0010] 在进一步的实施方案中, 抗激活素 A 化合物包含：

[0011] (a) 轻链 CDR3, 其包含选自以下的序列：

[0012] i. 与选自本文中公开的轻链 CDR3 序列的 CDR3 序列相差总共不超过两个氨基酸添加、置换和 / 或删除的轻链 CDR3 序列, 和；

[0013] ii.  $X_{73}QX_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$  (SEQ ID NO:132)；

[0014] iii.  $LQHNX_{81}YX_{82}X_{83}T$  (SEQ ID NO:131)；和

[0015] iv.  $QAWDX_{84}STX_{85}X_{86}$  (SEQ ID NO:248)；

[0016] 其中  $X_{73}$  是甲硫氨酸残基、谷氨酰胺残基或精氨酸残基,  $X_{74}$  是丙氨酸残基、酪氨酸残基、谷氨酰胺残基或丝氨酸残基,  $X_{75}$  是亮氨酸残基、酪氨酸残基或天冬酰胺残基,  $X_{76}$  是谷氨酰胺残基、丝氨酸残基或苏氨酸残基,  $X_{77}$  是苏氨酸残基、酪氨酸残基或异亮氨酸残基,  $X_{78}$  是脯氨酸残基或丝氨酸残基,  $X_{79}$  是半胱氨酸残基、色氨酸残基、亮氨酸残基或脯氨酸残基,  $X_{80}$  是丝氨酸残基或苏氨酸残基,  $X_{81}$  是苏氨酸残基或丝氨酸残基,  $X_{82}$  是脯氨酸残基或苏氨酸残基,  $X_{83}$  是苯丙氨酸残基或色氨酸残基,  $X_{84}$  是精氨酸残基或丝氨酸残基,  $X_{85}$  是缬氨酸残基或丙氨酸残基, 以及  $X_{86}$  是缬氨酸残基或无残基, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A ;或

[0017] (b) 重链 CDR3, 其包含选自以下的序列 :

[0018] i. 与选自本文中公开的重链 CDR3 序列的 CDR3 序列相差总共不超过三个氨基酸添加、置换和 / 或删除的重链 CDR3 序列 ;

[0019] ii.  $X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ FDY (SEQ ID NO: 187) ;

[0020] iii.  $X_{95}X_{96}X_{97}YX_{98}DX_{99}X_{100}GWX_{101}X_{102}X_{103}$  (SEQ ID NO: 188) ;

[0021] 和

[0022] iv.  $X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}YX_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$  (SEQ ID NO: 249)

[0023] 其中  $X_{87}$  是缬氨酸残基或无残基,  $X_{88}$  是谷氨酰胺残基或无残基,  $X_{89}$  是天冬氨酸残基、色氨酸残基或无残基,  $X_{90}$  是丝氨酸残基、亮氨酸残基或无残基,  $X_{91}$  是异亮氨酸残基、谷氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{92}$  是丙氨酸残基、亮氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{93}$  是丙氨酸残基或亮氨酸残基,  $X_{94}$  是脯氨酸残基, 酪氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{95}$  是天冬氨酸残基或无残基,  $X_{96}$  是谷氨酰胺残基或无残基,  $X_{97}$  是天冬氨酸残基或丙氨酸残基,  $X_{98}$  是酪氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{99}$  是丝氨酸残基或酪氨酸残基,  $X_{100}$  是丝氨酸残基或精氨酸残基,  $X_{101}$  是苯丙氨酸残基或无残基,  $X_{102}$  是甘氨酸残基或天冬氨酸残基,  $X_{103}$  是组氨酸残基或脯氨酸残基,  $X_{104}$  是甘氨酸残基或无残基,  $X_{105}$  是丝氨酸残基、谷氨酸残基或无残基,  $X_{106}$  是精氨酸残基、丝氨酸残基或无残基,  $X_{107}$  是天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、丝氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{108}$  是丝氨酸残基、精氨酸残基或色氨酸残基,  $X_{109}$  是甘氨酸残基、天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或亮氨酸残基,  $X_{110}$  是丝氨酸残基、甘氨酸残基、天冬氨酸残基或无残基,  $X_{111}$  是丝氨酸残基、缬氨酸残基、天冬酰胺残基或酪氨酸残基,  $X_{112}$  是丝氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或组氨酸残基,  $X_{113}$  是色氨酸残基、酪氨酸残基或谷氨酰胺残基,  $X_{114}$  是组氨酸残基、天冬氨酸残基、酪氨酸残基或无残基,  $X_{115}$  是苯丙氨酸残基、丙氨酸残基或甘氨酸残基,  $X_{116}$  是天冬氨酸残基、苯丙氨酸残基、亮氨酸残基或甲硫氨酸残基,  $X_{117}$  是酪氨酸残基或天冬氨酸残基,  $X_{118}$  是异亮氨酸残基、缬氨酸残基或无残基, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A ;或

[0024] (c) (a) 的轻链 CDR3 序列和 (b) 的重链 CDR3 序列, 并且所述抗激活素 A 化合物特异性地结合人激活素 A。

[0025] 在另一个实施方案中, 抗激活素 A 化合物包含 :

[0026] (a) 轻链可变结构域, 其包含 : i. 本文中公开的轻链 CDR1 序列 ; ii. 本文中公开的轻链 CDR2 序列 ; 和 iii. 本文中公开的轻链 CDR3 序列 ; 或

[0027] (b) 重链可变结构域, 其包含 : i. 本文中公开的重链 CDR1 序列 ; ii. 本文中公开的重链 CDR2 序列 ; 和 iii. 本文中公开的重链 CDR3 序列 ; 或

[0028] (c) (a) 的轻链可变结构域和 (b) 的重链可变结构域。

[0029] 在另一个实施方案中, 抗激活素 A 化合物包含 :

[0030] (a) 轻链可变结构域序列, 其选自 : i. 与本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列至少 80% 相同的氨基酸序列 ; ii. 通过与编码本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列的多核苷酸序列至少 80% 相同的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 和 iii. 通过在中等严格条件下与本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列组成的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 或

[0031] (b) 重链可变结构域序列, 其选自 : i. 与本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列至少 80% 相同的氨基酸序列 ; ii. 通过与编码本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列的多核苷酸序列至少 80% 相同的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 和 iii. 通过在中等严格条件下与本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列组成的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 或

[0032] (c) (a) 的轻链可变结构域和 (b) 的重链可变结构域 ; 其中所述抗原结合蛋白结合人激活素 A。

[0033] 在另一个实施方案中, 抗激活素 A 化合物包含 :

[0034] (a) 选自本文中公开的轻链可变结构域序列的 L1-L14 的轻链可变结构域序列 ; 或

[0035] (b) 选自本文中公开的重链可变结构域序列的 H1-H14 的重链可变结构域序列 ; 或

[0036] (c) (a) 的轻链可变结构域和 (b) 的重链可变结构域。

[0037] 在另一个实施方案中, 激活素 A 化合物包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB), 其中所述多肽选自 :

[0038] (a) 包含 SEQ ID NO:2 中所示序列的变体的多肽, 其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换, 其中位置 28 的置换选自 W 和 Y, 和位置 44 的置换是 T ;

[0039] (b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 19 至 134 中所示序列的变体的多肽, 其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换, 其中位置 28 的置换选自 W 和 Y, 和位置 44 的置换是 T ;

[0040] (c) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 23 至 134 中所示序列的变体的多肽, 其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换, 其中位置 28 的置换选自 W 和 Y, 和位置 44 的置换是 T ;

[0041] (d) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 25 至 134 中所示序列的变体的多肽, 其中所述变体序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换, 其中位置 28 的置换选自 W 和 Y, 和位置 44 的置换是 T ; 和

[0042] (e) 与 (a) 至 (d) 任一个具有至少 80% 序列同一性的多肽, 其中所述序列包含位置 28 的氨基酸置换和位置 44 的氨基酸置换, 其中位置 28 的置换选自 W 和 Y, 和位置 44 的置换是 T, 其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂 (myostatin)、激活素 A 或 GDF-11。

[0043] 在另一个实施方案中, 抗激活素 A 化合物包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB), 其中所述多肽选自 :



[0044] (a) 由 SEQ ID NO:4、6、12 和 14 的组中所示序列组成的多肽；

[0045] (b) 与 (a) 具有至少 90% 序列同一性的多肽，其中多肽在位置 28 具有 W 或 Y，和在位置 44 具有 T，其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11，和

[0046] (c) 与 (a) 具有至少 95% 序列同一性的多肽，其中多肽在位置 28 具有 W 或 Y，和在位置 44 具有 T，其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

[0047] 在进一步的实施方案中，多肽可操作地连接至少一个异源多肽。在另一个实施方案中，多肽在位置 64 包含丙氨酸残基。在另一个实施方案中，异源多肽包括 IgG Fc 结构域。在另一个实施方案中，异源多肽通过接头序列可操作地连接抗激活素 A 化合物。在进一步的实施方案中，接头选自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50。

[0048] 在另一个实施方案中，抗激活素 A 化合物包括选自以下的多肽：

[0049] (a) 由 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 的组中所示序列组成的多肽；

[0050] (b) 与 (a) 具有至少 90% 序列同一性的多肽，其中多肽在位置 28 具有 W 或 Y，和在位置 44 具有 T，其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11，和

[0051] (c) 与 (a) 具有至少 95% 序列同一性的多肽，其中多肽在位置 28 具有 W 或 Y，和在位置 44 具有 T，其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

[0052] 在一些实施方案中，治疗受试者的卵巢癌（包括浆液性卵巢癌和透明细胞卵巢癌）的方法包括施用治疗有效量的至少两种化合物：第一种化合物和第二种化合物，其中第一种化合物是抗激活素 A 化合物，和其中第二种化合物是化疗化合物。例如，化疗化合物可以是卡培他滨 (capecitabine) 或阿霉素脂质复合物。在进一步的实施方案中，用药物学上可接受的载体配制所述至少两种化合物中的一种或多种。在另一个实施方案中，在第一种化合物施用后施用第二种化合物。在另一个实施方案中，在施用第二种化合物后施用第一种化合物。在另一个实施方案中，第一种化合物和第二种化合物同时施用。

[0053] 在进一步的实施方案中，通过检测与对照比较的受试者中生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的升高的水平来鉴别受试者。在另一个实施方案中，通过包括以下步骤的方法来鉴别受试者：评价受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平；将受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阴性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平进行比较；和确定受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 因子的表达水平超过阴性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。在另一个实施方案中，通过包括以下步骤的方法来鉴别受试者：评价受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平；将受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阳性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平进行比较；和确定受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 因子的表达水平符合或超过阳性对照样品中的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。

[0054] 在另一个实施方案中，通过检测与对照比较的受试者中激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的升高的水平来鉴别受试者。在另一个实施方案中，通过包括以下步骤的方法来鉴别受试者：评价受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平；将受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平与阳性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1

因子的表达水平进行比较 ;和确定受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平超过阴性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平。在另一个实施方案中,通过包括以下步骤的方法来鉴别受试者 :评价受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平 ;将受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平与阳性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平进行比较 ;和确定受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平符合或超过阳性对照样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的表达水平。

[0055] 在另一个实施方案中,将抗激活素 A 化合物皮下、静脉内或腹膜内施用于受试者。在进一步的实施方案中,将抗激活素 A 化合物以至少 0.5mg/kg 的剂量施用于受试者,一周一次。在另一个实施方案中,将卡培他滨皮下、静脉内、腹膜内施用于受试者。在进一步的实施方案中,将卡培他滨口服施用于受试者。在进一步的实施方案中,将卡培他滨以 1250mg/m<sup>2</sup>的剂量施用于受试者,每日两次,持续两周。在一些实施方案中,将卡培他滨施用两周后,存在一周的休息期。在另一个实施方案中,将阿霉素脂质复合物皮下、静脉内或腹膜内施用于受试者。在另一个实施方案中,将阿霉素脂质复合物以 40mg/m<sup>2</sup>的剂量 IV 施用于受试者,每四周一次。

#### [0056] 附图简单说明

[0057] 参考以下描述和附图,将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优势,其中 :

[0058] 图 1 显示了卵巢癌受试者 (OC) 和正常对照受试者中的激活素 A 水平。\*\*\*p<0.001 ; student' s t- 检验 ;n = 20。

[0059] 图 2A 是显示了 sActRIIB 处理随着时间对 inh-KO 小鼠中血清激活素 A 水平的作用的曲线图。\*\*\*p<0.001vs. WT ;student' s t- 检验 ;n = 6-12。

[0060] 图 2B 是显示了 sActRIIB 处理随着时间对 inh-KO 小鼠中血清激活素 A 水平的作用的条形图。在 3 个条的每个组中,左条是野生型,中间条是 KO 加 PBS,而右条是 KO 加 sActRIIB。

[0061] 图 3A 是显示了 sActRIIB 处理随着时间对 inh-KO 小鼠中卵巢肿瘤质量的作用的曲线图。\*\*\*p<0.001vs. WT ;student' s t- 检验 ;n = 6-12。

[0062] 图 3B 是描绘 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠中晚期卵巢肿瘤的代表性总体形态。比例尺 = 5mm。

[0063] 图 4A 是显示了 sActRIIB 处理随着时间对 inh-KO 小鼠中睾丸肿瘤质量的作用的曲线图。在 3 个条的每个组中,左条是野生型,中间条是 KO 加 PBS,而右条是 KO 加 sActRIIB。

[0064] 图 4B 是描绘 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠中晚期睾丸肿瘤的代表性总体形态。比例尺 = 10mm。

[0065] 图 5A 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠的卵巢肿瘤中激活素 A mRNA 的两个 Northern 印迹分析。n = 10

[0066] 图 5B 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠的卵巢肿瘤中 p-Smad2 信号传导的两个 Western 印迹分析。n = 10

[0067] 图 6A 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠的卵巢肿瘤中 E- 钙粘蛋白的 Western 印迹分析。n = 10

[0068] 图 6B 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠中的卵巢切片中 E-钙粘蛋白的免疫组织化学染色,其中 E-钙粘蛋白染成灰色并且细胞核复染成红色。比例尺 = 50  $\mu\text{m}$ 。

[0069] 图 7A 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠中卵巢切片的代表性 H&E 显微图像。比例尺 = 500  $\mu\text{m}$ 。

[0070] 图 7B 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠中睾丸组织切片的代表性 H&E 显微图像。比例尺 = 500  $\mu\text{m}$ 。

[0071] 图 8A 显示了两张描绘 sActRIIB 处理对 inh-KO 小鼠中的血清 VEGF 的作用的曲线图。 $*p < 0.05$ ; student's t-检验;  $n = 10$ 。

[0072] 图 8B 显示了描绘 sActRIIB 处理对 inh-KO 小鼠的卵巢(上图)和睾丸(下图)肿瘤切片中的 VEGF 和 Ang-1 免疫反应性的作用的代表性免疫染色图像。比例尺 = 100  $\mu\text{m}$ 。 $**p < 0.01$ ; student's t-检验。条形图显示了 VEGF 和 Ang-1 免疫反应性的定量分析。

[0073] 图 8C 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠的卵巢或睾丸肿瘤中的 Ang-2 mRNA 表达水平的 Northern 印迹分析。

[0074] 图 8D 显示了 sActRIIB 处理后 inh-KO 小鼠的卵巢肿瘤中内皮糖蛋白(endoglin)、骨桥蛋白、IGFBP-1 和 IGFBP-2 蛋白的 Western 印迹分析。

[0075] 图 9 显示了描绘 sActRIIB 处理对 inh-KO 小鼠的卵巢(上图)和睾丸(下图)肿瘤中的半胱天冬酶-3 激活的作用的代表性免疫染色图像。箭头指向活性半胱天冬酶-3。条形图显示了活性半胱天冬酶-3 的定量分析。 $n = 10$ 。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; student's t-检验。

[0076] 图 10A 是显示了皮下 TOV-21G 植入后裸鼠中的血清激活素 A 水平的曲线图。 $**p < 0.01$ ; student's t-检验;  $n = 10$ 。

[0077] 图 10B 是显示了用 sActRIIB 或激活素 A 抗体处理后 TOV-21G 肿瘤体积变化的曲线图; $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$  vs. PBS;  $n = 12$ 。

[0078] 图 11 显示了两张描绘植入天然(naïve)或激活素 A 转染的 CHO 细胞的 CD1 裸鼠的激活素 A 抗体处理后肿瘤重量或肿瘤获取率(take rate)(通过植入后第 21 天四头肌中具有肉眼可鉴别肿瘤的小鼠的百分比来限定)。 $***p < 0.001$ ; 单侧 ANOVA;  $n = 12$ 。

[0079] 图 12 显示了两张描绘植入激活素 A 转染的 OV-90 细胞的 CD1 裸鼠的 sActRIIB 处理后的肿瘤体积或肿瘤重量的曲线图。 $*p < 0.05$ ;  $n = 12-13$ 。

[0080] 图 13 是显示了植入 TOV-21G 细胞的裸鼠中用 sActRIIB 和 5-氟尿嘧啶处理后的肿瘤体积的曲线图。 $***p < 0.001$  vs. PBS;  $^{\#}p < 0.05$  vs. 5-FU;  $^{\dagger}p < 0.01$  vs. sActRIIB;  $n = 12$ 。

[0081] 图 14 是显示了 sActRIIB 和激活素 A 抗体对 TOV-21G 细胞生长的作用的曲线图。

[0082] 图 15A 显示了描绘 sActRIIB 处理对小鼠中的 OV-21G 异种移植肿瘤中的 VEGF、Ang-1 和骨桥蛋白的作用的代表性免疫染色图像。条形图显示了 VEGF、Ang-1 和骨桥蛋白免疫反应性的定量分析。 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ 。

[0083] 图 15B 显示了描绘 sActRIIB 处理对小鼠中 TOV-21G 异种移植肿瘤中的 CD31 的作用的代表性免疫染色图像。 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ 。

[0084] 图 15C 显示了描绘 sActRIIB 处理对小鼠中 TOV-21G 异种移植肿瘤中的半胱天冬酶-3 激活和细胞凋亡的作用的代表性免疫染色图像。条形图显示了半胱天冬酶-3 免疫反

应性和由于细胞凋亡引起的免疫反应性变化的定量分析。 $*p<0.05$  ;  $**p<0.01$  ;  $***p<0.001$ 。

[0085] 图 16A 显示了用重组激活素 A 和 sActRIIB 处理后 TOV-21G、BAEC、MRC-5、CCD-Lu 和 U937 细胞培养中 VEGF-A mRNA 表达水平的曲线图。 $*p<0.05$  ;  $**p<0.01$  ;  $***p<0.001$  ; student's t- 检验 ;  $n = 3$ 。

[0086] 图 16B 显示了用重组激活素 A 和 sActRIIB 处理后 BAEC、MRC-5 和 CCD-Lu 细胞培养中 Ang-1 mRNA 表达水平的曲线图。 $*p<0.05$  ;  $**p<0.01$  ;  $***p<0.001$  ; student's t- 检验 ;  $n = 3$ 。

[0087] 图 17A 显示了用重组激活素 A 和 sActRIIB 处理后 TOV-21G、MRC-5、CCD-Lu 和 THP-1 细胞培养中 VEGF 水平的曲线图。 $*p<0.05$  ;  $**p<0.01$  ;  $***p<0.001$  ; student's t- 检验 ;  $n = 3$ 。

[0088] 图 17B 显示了用重组激活素 A 和 sActRIIB 处理后 MRC-5 和 CCD-Lu 细胞培养物中 Ang-1 水平的曲线图。 $*p<0.05$  ;  $**p<0.01$  ;  $***p<0.001$  ; student's t- 检验 ;  $n = 3$ 。

[0089] 图 18 显示了用重组激活素 A 和 sActRIIB 处理后 TOV-21G、BAEC、MRC-5、CCD-Lu、U937 和 THP-1 细胞培养物中激活素 A mRNA 表达水平的曲线图。

[0090] 图 19 显示了 sActRIIB 处理对裸鼠中人 G361 黑素瘤异种移植物生长的作用以及激活素 A 抗体对裸鼠中 5637 膀胱癌异种移植物生长的作用。 $*p<0.05$  ;  $**p<0.01$ 。

[0091] 图 20 显示了各种细胞类型中激活素 A 转录物的水平, 基于 Oncomine 微阵列数据库的分析。

[0092] 图 21 显示了雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中 sActRIIB 单剂量、退出和重新给药对体重的作用。将雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的体重作为平均  $\pm$  SEM 绘图 ; 用 sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 组 vs. PBS,  $***p<0.001$ 。sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 组 vs. WT 组,  $^{\&}p<0.05$  和  $^{\&\&}p<0.01$ 。PBS 处理的 Inh  $\alpha$  KO 组 vs. WT 组,  $^{\#\#\#}p<0.001$ 。

[0093] 图 22 显示了雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中从单剂量 sActRIIB 得到的存活百分比的曲线图, 其中卡方 = 23.72, P 值  $<0.0001$ , 并且存活曲线是显著差异的。使用 GraphPad Prism 5.0 软件, 通过卡方 t- 检验分析存活数据。 $p<0.0001$ : sActRIIB vs. PBS,  $n = 8$  至 18。

[0094] 图 23 显示了描绘单剂量 sActRIIB 后 2 周时雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中卵巢肿瘤重量的条形图。将数据作为平均  $\pm$  SEM 绘图 ;  $**p<0.01$ 。标准 2- 侧 Student's t- 检验 (MS Excel 5.0),  $n = 8$ 。

[0095] 图 24 显示了描绘单剂量 sActRIIB 后 8 周时和单剂量 sActRIIB 重新施用 (第 8 周) 后 12 周时雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中卵巢肿瘤重量的条形图。将数据作为平均  $\pm$  SEM 绘图 ;  $***p<0.01$ 。

[0096] 图 25 显示了 sActRIIB 结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤小鼠的体重的作用的曲线图。纵向记录体重。将数据作为平均  $\pm$  SEM 绘图,  $n = 10$  至 18/ 组。通过  $^{aaa}p<0.001$ : TOV-21G+sActRIIB vs. TOV-21G+PBS ;  $^{bb}p<0.01$ ,  $^{bbb}p<0.001$ : TOV-21G+sActRIIB vs. 正常 +PBS ;  $^{c}p<0.05$ : TOV-21G+DOX vs. 正常 +PBS ;  $^{dd}p<0.01$ : TOV-21G+DOX+sActRIIB vs. 正常 +PBS ;  $^{eee}p<0.001$ : TOV-21G+DOX+sActRIIB vs. TOV-21G+PBS ;  $^{ff}p<0.01$ ,  $^{fff}p<0.001$ : TOV-21G+DOX+sActRIIB vs. TOV-21G+DOX+PBS 来表示统计学显著性。

[0097] 图 26 显示了 sActRIIB 结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的肿瘤大

小（上）和重量（下）的作用。作为平均 ± 平均值的标准误差（SEM）将肿瘤大小（上图）和肿瘤重量（下图）绘图；n = 10 至 18/ 组。通过 \*p<0.05, \*\*p<0.01:TOV-21G+DOX+sActRIIB vs. TOV-21G+PBS ;<sup>#</sup>p<0.05 ;<sup>##</sup>p<0.01:TOV-21G+DOX vs. TOV-21G+PBS ;<sup>&</sup>p<0.05:TOV-21G+DOX+sActRIIB vs. TOV-21G+DOX 来表示统计学显著性。

[0098] 图 27 显示了说明 sActRIIB 结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的肌肉质量的作用的条形图。在最终尸检时测定了瘦胴体和腓肠肌重量。将数据作为平均 +SEM 绘图；n = 10 至 18/ 组。通过 \*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 来表示统计学显著性。

[0099] 图 28 显示了说明激活素 A 抗体对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中的血清激活素 A 水平的作用的条形图。作为平均 ± SEM 将雌性 Inh α KO 小鼠组中的游离激活素 A 水平的测量绘图；\*\*\*p<0.001 和 \*\*p<0.01。

[0100] 图 29 显示了激活素 A 抗体处理对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠体重的作用。作为平均 ± SEM 将雌性 Inh α KO 小鼠的体重测量绘图；对于用激活素 A 抗体处理的 Inh α KO 组 vs PBS, \*\*p<0.01 和 \*\*\*p<0.001。对于激活素 A 抗体处理的 Inh α KO 组 vs PBS 处理的 WT 组, <sup>&</sup>p<0.05 和 <sup>&&</sup>p<0.01。对于 PBS 处理的 Inh α KO 组 vs PBS 处理的 WT 组, <sup>#</sup>p<0.05。

[0101] 图 30 显示了激活素 A 抗体处理对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中的瘦体重和脂肪体重的作用。作为平均 ± SEM 将雌性 Inh α KO 小鼠中的瘦体重（上图）和脂肪体重（下图）的测量绘图；对于用激活素 A 抗体处理的 Inh α KO 组 vs PBS, \*\*\*p<0.001 和 \*\*p<0.01。对于激活素 A 抗体处理的 Inh α KO 组 vs PBS 处理的 WT 组, <sup>&&&</sup>p<0.01。对于 PBS 处理的 Inh α KO 组 vs PBS 处理的 WT 组, <sup>###</sup>p<0.001。

[0102] 图 31 显示了说明激活素 A 抗体处理对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中的腓肠肌重量的作用的条形图。作为平均 ± SEM 将腓肠肌重量绘图。\*\*\*p<0.001, \*p<0.01\*, \*p<0.05。

[0103] 图 32A 显示了激活素 A 抗体处理对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中的卵巢重量的作用。作为平均 ± SEM 将数据作图；\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01。

[0104] 图 32B 显示了激活素 A 抗体处理对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中的子宫重量的作用。作为平均 ± SEM 将数据作图；\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01。

[0105] 图 33 显示了说明激活素 A 抗体处理对雌性 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠中的血清 VEGF 水平的作用的条形图。作为平均 ± SEM 将血清 VEGF 水平的测量绘图；\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.05。

[0106] 图 34 显示了激活素 A 抗体处理对 Inh α KO 小鼠和野生型同窝对照小鼠的卵巢肿瘤组织中的 VEGF 和促血管生成素 -1 蛋白表达水平的作用。上图：卵巢组织切片上 VEGF 和 Ang-1 免疫染色（灰蓝色）的代表性图像。用 Fast Red 对核进行复染。条形图：通过用 Metamorph 软件成像来定量每组 3 只动物的卵巢切片中 VEGF 和 Ang-1 的免疫反应性，并作为平均 ± SEM 绘图。\*\*\*p<0.001 和 \*p<0.05。

[0107] 图 35 显示了激活素 A 抗体结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠的体重的作用。纵向记录体重。箭头指向阿霉素给药的时间。作为平均 ± SEM 将数据绘图；n = 8-14/ 组。使用标准 2- 侧 Student' s t- 检验 (MS Excel 5.0) 来分析组之间的差异。通过 \*:p<0.05: 正常 vs. TOV-21G+PBS ;<sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001: 正常 vs. TOV-21G+DOX ;

$\text{¥}$ : $p < 0.05$ :TOV-21G+PBS vs. TOV-21G+ 激活素 Ab 来表示统计显著性。

[0108] 图 36 显示了激活素 A 抗体结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的肿瘤大小的作用。作为平均  $\pm$  平均值的标准误差 (SEM) 将肿瘤大小的测量绘图;  $n = 8-14$ / 组。使用标准 2- 侧 Student' s t- 检验 (MS Excel 5.0) 来分析组之间的差异。通过  $\ast p < 0.05$ ,  $\ast\ast p < 0.01$ :TOV-21G+ 激活素 Ab vs. TOV-21G+PBS,  $\ast\ast\ast p < 0.01$ ;  $\ast\ast\ast\ast p < 0.001$ :TOV-21G+DOX vs. TOV-21G+PBS;  $\ast\ast\ast p < 0.01$ ;  $\ast\ast\ast\ast p < 0.001$ :TOV-21G+DOX+ 激活素 Ab vs. TOV-21G+PBS;  $\text{¥} p < 0.05$ ;  $\text{¥¥} p < 0.01$ :TOV-21G+DOX+ 激活素 Ab vs. TOV-21G+DOX 来表示统计显著性。

[0109] 图 37 显示了激活素 A 抗体结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的肿瘤重量的作用。作为平均  $\pm$  平均值的标准误差 (SEM) 将肿瘤重量的测量绘图;  $n = 8-14$ / 组。使用标准 2- 侧 Student' s t- 检验 (MS Excel 5.0) 来分析组之间的差异。通过  $\ast p < 0.05$ ;  $\ast\ast p < 0.01$ ;  $\ast\ast\ast p < 0.001$  来表示统计显著性。

[0110] 图 38 显示了激活素 A 抗体结合阿霉素对带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的肌肉质量的作用。在最终尸检程序时测定瘦胴体和腓肠肌重量。作为平均  $\pm$  SEM 将数据绘图;  $n = 8-14$ / 组。使用标准 2- 侧 Student' s t- 检验 (MS Excel 5.0) 来分析组之间的差异。通过  $\ast p < 0.05$ ;  $\ast\ast p < 0.01$ ;  $\ast\ast\ast p < 0.001$  来表示统计显著性。

### 具体实施方式

[0111] 本发明涉及阻断激活素 A 的作用。体内阻断激活素 A 减少几种肿瘤血管生成因子并防止肿瘤新血管生成, 由此诱导肿瘤凋亡。在一些方面中, 本发明提供了通过评价受试者的各种因子的表达水平来鉴别受试者的卵巢癌的方法。在一些方面中, 本发明还提供了通过将包括抗激活素 A 抗体和激活素受体的抗激活素 A 化合物施用于受试者来治疗卵巢癌的方法, 包括浆液性卵巢癌。在一些方面中, 本发明进一步提供了通过将至少抗激活素 A 化合物和化疗化合物施用于受试者来治疗卵巢癌的方法, 包括浆液性卵巢癌、透明细胞卵巢癌、颗粒细胞卵巢癌、莱迪希细胞肿瘤和性索基质睾丸肿瘤。

[0112] 以下描述中列出了一个或多个实施方案的详细内容。从说明书和附图以及从权利要求将清楚其他特征、目的和优势。

[0113] 激活素 A 是多肽链  $\beta A$  的同型二聚体 (参见 GenBank Accession No:NM\_002192)。激活素 A、B 和 AB 分别是两个多肽链  $\beta A$  和  $\beta B$  的同型二聚体和杂二聚体。术语“激活素”是指激活素 A、激活素 B 和激活素 AB, 以及该蛋白质的变体和物种同源物。

[0114] 本发明提供涉及结合激活素 A 的分子的组合物、试剂盒和方法, 包括激动或拮抗激活素 A 的分子和抗原结合蛋白, 如激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB)、svActRIIB 片段、svActRIIB 衍生物、抗激活素 A 抗体、抗体片段和抗体衍生物, 例如, 拮抗性抗激活素 A 抗体、抗体片段或抗体衍生物。还提供了涉及特异性结合激活素 A 的一部分 (如激活素 A 的氨基酸 R13-Y39 或氨基酸 V82-N107) 的分子的组合物、试剂盒和方法。这样的分子可以包括抗体、抗体片段和抗体衍生物。还提供了核酸及其衍生物和片段, 包括编码结合激活素 A 的多肽的全部或一部分的核苷酸序列, 例如, 编码激活素 IIB 受体、svActRIIB 片段、svActRIIB 衍生物、抗激活素 A 抗体、抗体片段、抗体变体或抗体衍生物的全部或一部分的核酸, 包括这样的核酸的质粒和载体, 以及包括这样的核酸和 / 或载体和质粒的细胞或细胞系。所提

供的方法包括,例如,制备、鉴别或分离结合激活素 A 的分子(如激活素 IIB 受体、抗激活素 A 抗体)的方法,确定分子是否结合激活素 A 的方法,制备包含结合激活素 A 的分子的组合物(如药物组合物)的方法,以及将结合激活素 A 的分子施用于受试者的方法,例如,用于治疗由激活素 A 介导的病症和用于体内或体外调节激活素 A 的生物活性的方法。

[0115] 本发明涉及含有由还结合全长激活素 A 的抗体识别的半胱氨酸结构域的人激活素 A 的区域,和 / 或与激活素 A 的半胱氨酸结区重叠或包括激活素 A 的半胱氨酸结区的区域,以及制备和使用这些半胱氨酸结构域的方法。本发明还提供特异性结合激活素 A 或激活素 A 的部分的抗原结合剂,包括抗体,以及使用这样的结合剂的方法。结合剂可用于阻断或削弱人激活素 A 与一种或多种配体的结合。

[0116] 激活素可以与两个结构上相关类别的丝氨酸 / 苏氨酸激酶受体 (I 型和 II 型) 相互作用。抑制素通过结合蛋白聚糖、 $\beta$  聚糖和与 II 型激活素受体形成稳定复合物并由此整合 II 型激活素受体同时排除 I 型受体来拮抗激活素。存在两种主要形式的激活素:激活素 A 是  $\beta_A$ - 亚基的同型二聚体,而激活素 B 是  $\beta_B$ - 亚基的同型二聚体 (Vale 等, *Recent Prog Horm Res* V. 44:1-34, 1988)。与任一  $\beta$ - 亚基不相似的  $\alpha$ - 亚基的杂二聚体形成功能拮抗剂抑制素。

[0117] 文献已经表明激活素 A 在癌症组织中超表达和 / 或定位在癌症组织中。例如,在患有子宫内膜癌和宫颈癌的女性中发现了高水平的血清激活素 A (Petraglia, F. 等, *Jour. Clin. Endocrin. Metab.* 83:1194-1200, 1998)。激活素 A 在 IV 期结肠直肠癌中超表达 (Wildi, S. 等, *Gut* 49:409-417, 2001)。报道了激活素 A 在卵巢癌中的作用 (Steller, M. D. 等, *Mol. Cancer Res.* 3:50-61, 2005)。

[0118] 文献还报道了激活素 A 牵涉到肾病 (Yamashita, S. 等, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:91-101, 2004.)。Harada, K. 等在 *J. Clin. Endocrin. and Metab.* 81:2125-2130, 1996 中报道了正常受试者和患病患者的血清免疫反应性激活素 A 水平。激活素 A 是肾间质成纤维细胞的强效激活剂 (Harada, K. 等, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:91-101, 2004)。肾小球激活素 A 超表达与抗 -Thy1 肾小球性肾炎中的纤维化相关 (Gaedeke, J. 等, *Neph. Dial. Transpl.* 20:319-328, 2005)。

[0119] 心力衰竭患者中的血清激活素 A 水平根据疾病严重程度而提高 (Yndestad 等, *Circulation* 109:1379-1385, 2004)。在心力衰竭的大鼠模型中,心肌梗死后血清激活素 A 水平立即升高并持续六个月,并且激活素 A 免疫染色只定位于心肌细胞 (Yndestad 等, 2004)。心力衰竭中报道了升高的激活素 A 水平 (Yndestad, A. 等, *Circulation* 109:1379-1385, 2004)。

[0120] 除非本文中另外限定,结合本发明使用的科学和技术术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外要求,单数术语应当包括复数并且复数术语应当包括单数。通常,结合本文中所述的细胞和组织培养物、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交使用的命名以及本文中所述的细胞和组织培养物、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交的技术中是本领域公知和常用的那些。通常根据本领域公知的以及本发明说明书中引用和讨论的各种一般和更特定的参考文献中所述的来进行本发明的方法和技术,除非另外指出。参见,例如, Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室手册),

第 2 版,冷泉港实验室出版社, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 和 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学通用实验方案), Greene Publishing Associates(1992) 以及 Harlow and Lane Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册),冷泉港实验室出版社, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990), 将其按引用并入本文中。根据制造商的说明进行酶反应和纯化技术,如本领域中常规完成的或本文中所述的。结合本文中所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的术语以及本文中所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学的实验室程序和技术是本领域公知和常用的那些。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送,以及患者的治疗。

[0121] 除非另外指出,以下术语应当理解为具有以下含义:

[0122] 术语“分离的分子”(在分子是例如多肽、多核苷酸或抗体的情况中)是按照其起源或衍生来源,(1)与在其天然状态下伴随的至少一种天然相关组分不相关,(2)基本上不含来自相同物种的其他分子,(3)通过来自不同物种的细胞表达,或(4)自然界没有出现的分子。因此,化学合成的分子或在不同于其天然起源的细胞的细胞系统中合成的分子是与其天然相关组分“分离的”。还可以使用本领域公知的纯化技术,通过分离使得分子基本上不含天然相关组分。可以通过本领域公知的各种方式来测定分子纯度或同质性。例如,可以使用聚丙烯酰胺凝胶电泳来测定多肽样品的纯度,并使用本领域公知的技术通过凝胶的染色来可视化多肽。对于特定的目的,可以通过使用 HPLC 或本领域公知的用于纯化的其他方式来提供较高的分辨率。

[0123] 术语“抗激活素 A 化合物”、“激活素 A 抑制剂”和“激活素 A 拮抗剂”可以互换使用。各自都是可检测地抑制激活素 A 的至少一种功能的分子。相反地,“激活素 A 激动剂”是可检测地提高激活素 A 的至少一种功能的分子。激活素 A 抑制剂引起的抑制不需要是完全的,只要使用试验可检测即可。可以使用激活素 A 功能的任何分析方法,本文中提供了其实例。可以通过激活素 A 抑制剂抑制的或通过激活素 A 激动剂提高的激活素 A 的功能的实例包括与激活素 A 的结合。激活素 A 抑制剂和激活素 A 激动剂的类型的实例包括,但不限于,激活素 A 结合多肽,如抗原结合蛋白(例如,激活素 A 抑制抗原结合蛋白)、激活素 IIB 受体(svActRIIB)、svActRIIB 片段、svActRIIB 衍生物、抗体、抗体片段和抗体衍生物。

[0124] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”各自是指包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸残基的分子。这些术语包括,例如,天然和人工蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物(如突变蛋白、变体和融合蛋白)以及翻译后或另外共价或非共价地修饰的蛋白质。肽、多肽或蛋白质可以是单体或聚合的。使用标准的一字母或三字母缩写来表示多核苷酸和多肽序列。除非另外指出,多肽序列在左侧具有其氨基端和在右侧具有其羧基端,而单链核酸序列和双链核酸序列的上链在左侧具有其 5' 端和在右侧具有其 3' 端。特定的多肽或多核苷酸序列还可以通过解释其与参照序列怎样不同来描述。除非另外指出,应理解多核苷酸和多肽序列各自包括分别列出的核酸或氨基酸,以及插入核酸或氨基酸。例如,多肽序列 R13-Y39 表示包括氨基酸 R13 和 Y39 以及多肽序列中 R13 和 Y39 之间发现的氨基酸的多肽序列。相应地,多核苷酸序列 C1-T5 表示包括核酸 C1 和 T5 以及序列的位置 2、3 和 4 的核酸的多核苷酸序列。因此,SEQ ID NO:1-5 的名称同样指出了 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 的包含组。最终,氨基酸分组也意图是包含的,除非另外指出。例如,短语“SEQ ID NO:28 的氨基酸 1-5”包括 SEQ ID NO:28 的位置



1、2、3、4 和 5 的氨基酸。

[0125] 本发明的多肽包括已经以任何方式和为了任何原因修饰的多肽,例如,以(1)降低对蛋白水解的易感性,(2)降低对氧化的易感性,(3)为了形成蛋白质复合物而改变结合亲和性,(4)改变结合亲和性和(4)给予或改变其他生理化学或功能特性。类似物包括多肽的突变蛋白。例如,可以在天然产生的序列中(例如,在形成分子间接触的结构域外的多肽部分中)进行单个或多个氨基酸置换(例如,保守性氨基酸置换)。“保守性氨基酸置换”是基本上没有改变母体序列的结构特征的置换(例如,置换氨基酸应当不倾向于破坏母体序列中存在的螺旋,或干扰表征母体序列或其功能性必需的其他类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级和三级结构的实例描述于 *Proteins, Structures and Molecular Principles*(蛋白质,结构和分子原理)(Creighton 编辑, W. H. Freeman and Company, New York(1984)); *Introduction to Protein Structure*(蛋白质结构介绍)(C. Branden 和 J. Tooze 编辑, Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); 和 Thornton 等, *Nature* 354:105(1991),将每一篇按引用并入本文中。

[0126] 如本文中使用的术语“多肽片段”是指与相应的全长蛋白质相比具有氨基端和/或羧基端删除的多肽。片段可以是,例如,至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、50、70、80、90、100、150 或 200 个氨基酸长。片段还可以是,例如,至多 1,000、750、500、250、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、14、13、12、11 或 10 个氨基酸长。片段可以进一步在其任一端或两端包括一个或多个其他氨基酸,例如,来自不同天然产生的蛋白质的氨基酸序列(例如, Fc 或亮氨酸拉链结构域)或人工氨基酸序列(例如,人工接头序列)。

[0127] 多肽(例如,抗体)的“变体”包括其中相对于天然多肽序列将一个或多个氨基酸残基插入氨基酸序列、从氨基酸序列删除一个或多个氨基酸和/或置换氨基酸序列中的一个或多个氨基酸,并基本上保持与天然多肽相同的生物活性的氨基酸序列。可以使用本领域的标准技术来测量多肽的生物活性(例如,如果变体是抗体,可以通过如本文中所述的结合试验来测试其活性)。本发明的变体包括片段、类似物、重组多肽、合成多肽和/或融合蛋白质。多肽的“衍生物”是已经过化学修饰的多肽(例如,抗体),例如,通过缀合另一个化学部分,如,例如,聚乙二醇、白蛋白(例如,人血清白蛋白),磷酸化和糖基化。除非另外指出,除了包含两个全长重链和两个全长轻链的抗体,术语“抗体”包括其衍生物、变体、片段和突变蛋白,以下描述其实例。

[0128] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”在全文中可互换使用,并且包括 DNA 分子(例如, cDNA 或基因组 DNA)、RNA 分子(例如, mRNA)、使用核苷酸类似物产生的 DNA 或 RNA 的类似物(例如,肽核酸和非天然产生的核苷酸类似物),及其杂合体。核酸分子可以是单链或双链的。在一个实施方案中,本发明的核酸分子包括编码本发明抗体,或其片段、衍生物、突变蛋白或变体的连续开放阅读框。

[0129] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况中的术语百分“同一性”是指针对最大对应性比较和比对时,通过使用 GAP 计算机程序(GCG Wisconsin Package 的一部分,版本 10.3(Accelrys, San Diego, CA))采用其缺省参数比较序列而确定的具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列。根据应用,百分“同一性”可以存在于所比较的序列的区域上,例如,在功能性区域上,或可选地,存在于待比较的两个序列的全长上。

[0130] 对于序列比较,通常一个序列作为参照序列,测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参照序列输入计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参照序列的百分序列同一性。

[0131] 如果两个单链多核苷酸的序列可以以反平行方向比对以使得一个多核苷酸中的每个核苷酸与另一个多核苷酸中的其互补核苷酸相对而没有引入空位且在任一序列的 5' 或 3' 端没有未配对的核苷酸,则这两个单链多核苷酸是彼此的“互补序列”。如果两个多核苷酸可以在中等严格条件下彼此杂交,则该多核苷酸与另一个核苷酸是“互补的”。因此,多核苷酸可以与不是其互补序列的另一个多核苷酸是互补的。

[0132] “载体”是可以用于将另一个与其连接的核酸引入细胞中的核酸。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可以连接另外的核酸区段的线性或环状双链 DNA 分子。另一种类型的载体是病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其中可以将另外的 DNA 区段引入病毒基因组中。特定的载体能够在其中引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,包括细菌复制起点和游离体哺乳动物载体)。在引入宿主细胞中时,其他载体(如,非-游离体因哺乳动物载体)整合至宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。“表达载体”是一种可以指导选定的多核苷酸表达的载体。

[0133] 如果调控序列影响多核苷酸序列的表达(例如,表达的水平、时机或位置),则核苷酸序列与调控序列是“可操作地连接的”。“调控序列”是影响与其可操作地连接的核酸的表达(例如,表达的水平、时机或位置)的核酸。调控序列可以是,例如,对受调控的核酸直接发挥作用,或通过一个或多个其他分子(例如,结合调控序列和/或核酸的多肽)的作用发挥其作用。调控序列的实例包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。调控序列的更多实例描述于,例如,Goeddel,1990, Gene Expression Technology:Methods in Enzymology(基因表达技术:酶学方法)185,Academic Press,San Diego,CA 和 Baron 等,1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06。

[0134] “宿主细胞”是可以用于表达核酸(例如,本发明的核酸)的细胞。宿主细胞可以是原核生物的,例如,大肠杆菌,或可以是真核生物的,例如,单细胞真核生物(例如,酵母或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。宿主细胞的实例包括 CS-9 细胞、猴肾细胞的 COS-7 系(ATCC CRL 1651)(参见 Gluzman 等,1981, Cell 23:175)、L 细胞、C127 细胞、3T3 细胞(ATCC CRL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞及其衍生物,如 V Reggie CHO 和生长在无血清培养基中的相关细胞系(参见 Rasmussen 等,1998, Cytotechnology 28:31)、HeLa 细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、源自非洲绿猴肾细胞系 CV1(ATCC CCL 70)的 CV1/EBNA 细胞系(参见 McMahan 等,1991, EMBO J. 10:2821)、人胚胎肾细胞,如 293、293EBNA 或 MSR 293、人表皮 A431 细胞、人 Colo205 细胞、其他转化的灵长类细胞系、正常的二倍体细胞、源自原代组织、原代外植体的体外培养物的细胞株,HL-60、U937、HaK 或 Jurkat 细胞。通常,宿主细胞是可以用多肽编码核酸转化或转染的培养细胞,所述多肽编码核酸随后可以在宿主细胞中表达。短语“重组宿主细胞”可以用于表示已经用待表达的核酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是包含核酸但不以所需水平表达该核酸的细胞,除非将调控序列引入宿主细胞中以使其与该核酸可操作地连接。应理解术语宿主细胞不仅是指特定的受试

者细胞,而且还指这种细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响导致在后续世代中可能会发生某些改变,这样的后代实际上可能不同于母细胞,但仍然包括在本文中使用的术语范围内。

#### [0135] 核酸

[0136] 在一个方面中,本发明提供了分离的核酸分子。核酸包括,例如,编码全部或部分抗原结合蛋白(例如,本发明的抗体的一条或两条链,或其片段、衍生物、突变蛋白或变体)的多核苷酸,足以用作杂交探针的多核苷酸,用于鉴别、分析、突变或扩增编码多肽的多核苷酸的 PCR 引物或测序引物,用于抑制多核苷酸表达的反义核酸和前述的互补序列。核酸可以是任何长度的。它们可以是,例如,5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、3,000、5,000 或更多个核苷酸长,和 / 或可以包括一个或多个另外的序列,例如,调控序列,和 / 或是较大核酸的部分,例如,载体。核酸可以是单链或双链的,并且可以包括 RNA 和 / 或 DNA 核苷酸,及其人工变体(例如,肽核酸)。

[0137] 可以从已经用激活素 A 免疫的小鼠的 B 细胞分离编码抗体多肽(例如,重链或轻链、仅可变结构域或全长)的核酸。可以通过常规程序,如聚合酶链式反应(PCR),来分离核酸。

[0138] 本文中显示了编码重链和轻链可变区的可变区的核酸序列。本领域技术人员将认识到,由于遗传密码的简并性,本文中公开的每个多肽序列由大量的其他核酸序列编码。本发明提供了编码本发明的每个抗原结合蛋白的每个简并核苷酸序列。

[0139] 本发明进一步提供了在特定杂交条件下与其他核酸(例如,包括 A1-A14 中任一的核苷酸序列的核酸)杂交的核酸。杂交核酸的方法是本领域公知的。参见,例如, Curr. Prot. in Mol. Biol., John Wiley&Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6。如本文中限定的,中等严格杂交条件使用含有 5X 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) 的预洗溶液,约 50% 甲酰胺、6X SSC 的杂交缓冲液,和 55°C 的杂交温度(或其他相似的杂交溶液,如含有约 50% 甲酰胺的,42°C 的杂交温度)以及 0.5X SSC、1% SDS 中 60°C 的洗涤条件。严格杂交条件在 45°C 下在 6X SSC 中杂交,接着在 68°C 下 0.1X SSC、2% SDS 中一次或多次洗涤。此外,本领域技术人员可以操纵杂交和 / 或洗涤条件来提高或降低杂交的严格性,使得包括彼此至少 65、70、75、80、85、90、95、98 或 99% 相同的核苷酸序列的核酸通常保持彼此能杂交。影响杂交条件选择的基础参数和设计合适条件的指导由例如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验室手册), 冷泉港实验室出版社, Cold Spring Harbor, N. Y., 第 9 和 11 章;和 Curr. Prot. in Mol. Biol. 1995, Ausubel 等编辑, John Wiley&Sons, Inc. 2. 10 和 6. 3-6. 4 节) 提供,并且可以由本领域普通技术人员基于例如 DNA 的长度和 / 或碱基组成来容易地确定。

[0140] 可以通过突变将变化引入核酸中,由此导致其编码的多肽(例如,抗原结合蛋白)的氨基酸序列的变化。可以使用本领域已知的任何技术来引入突变。在一个实施方案中,使用例如定点诱变方案来改变一个或多个特定的氨基酸残基。在另一个实施方案中,使用例如随机诱变方案来改变一个或多个随机选择的残基。然而在进行时,可以针对所需特性(例如,与激活素 A 的结合)来表达和筛选突变多肽。

[0141] 可以将突变引入核酸中而不显著改变其编码的多肽的生物活性。例如,可以形成

导致非必需氨基酸残基处的氨基酸置换的核苷酸置换。在一个实施方案中,本文中针对 A1-A14 或其所需片段、变体或衍生物提供的核苷酸序列是突变的以使得其编码包括本文中针对 A1-A14 残基所示的氨基酸残基的一个或多个删除或置换的氨基酸序列,其中两个或更多个序列不同。如本文中特别描述的,A1-A14 是指 14 个序列,A1 和 A14 以及 12 个插入氨基酸残基。在另一个实施方案中,诱突插入与本文中针对 A1-A14 所示的一个或多个氨基酸残基相邻的氨基酸,其中两个或多个序列不同。或者,可以将一个或多个突变引入核酸中,其选择性地改变其编码的多肽的生物活性(例如,激活素 A 的结合)。例如,突变可以定量或定性地改变生物活性。定量改变的实例包括提高、降低或消除活性。定性改变的实例包括改变抗原结合蛋白的抗原特异性。

[0142] 在另一个方面中,本发明提供了适宜用作用于检测本发明的核酸序列的引物或杂交探针的核酸分子。本发明的核酸分子可以只包括编码本发明的全长多肽的核酸序列的一部分,例如,可以用作探针或引物的片段或编码本发明多肽的活性部分(例如,激活素 A 结合部分)的片段。

[0143] 基于本发明核酸序列的探针可以用于检测核酸或相似核酸,例如,编码本发明多肽的转录物。探针可以包括标记基团,例如,放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。这样的探针可以用于鉴别表达多肽的细胞。

#### [0144] 表达载体

[0145] 本发明提供了包括编码本发明的多肽或其部分的核酸的载体。载体的实例包括,但不限于,质粒、病毒载体、非游离体哺乳动物载体和表达载体,例如,重组表达载体。

[0146] 在本发明的另一个方面中,还提供了含有本发明的核酸分子和多核苷酸的表达载体,还提供了用这些载体转化的宿主细胞和产生多核苷酸的方法。术语“表达载体”是指用于从多核苷酸序列表达多肽的质粒、噬菌体、病毒或载体。用于多肽表达的载体含有载体扩增和表达克隆的插入片段需要的最小序列。表达载体包括转录单位,其包含(1)在基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件,例如,启动子或增强子,(2)待转录成 mRNA 或翻译成蛋白质的编码多肽和蛋白质的序列和(3)合适的转录启动和终止序列的组件。这些序列可以进一步包括选择标记。适用于在宿主细胞中表达的载体是容易获得的并且使用标准重组 DNA 技术将核酸分子插入载体中。这样的载体可以包括在特定组织中起作用的启动子,和用于多肽在靶定的人或动物细胞中表达的病毒载体。例如,适用于 svActRIIB 表达的表达载体是 pDSRa(描述于 W090/14363 中,按引用并入本文中)及其衍生物,含有 svActRIIB 多核苷酸,以及本领域已知的任何其他合适的载体。

[0147] 本发明的重组表达载体可以以适用于核酸在宿主细胞中表达的形式包含本发明的核酸。重组表达载体包括基于待用于表达的宿主细胞选择的一个或多个调控序列,其可操作地连接待表达的核酸序列。调控序列包括指导核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中组成型表达的那些(例如,SV40 早期基因增强子、劳氏肉瘤病毒启动子和巨细胞病毒启动子),仅在特定宿主细胞中指导核苷酸序列表达的那些(例如,组织特异性调控序列,参见, Voss 等,1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis 等,1987, Science 236:1237,将其全部按引用并入本文中),和指导多核苷酸序列响应于特定处理或条件诱导型表达的那些(例如,哺乳动物细胞中的金属硫蛋白启动子以及原核和真核系统中的 tet- 反应性和/或链霉素反应性启动子)(参见上文)。本领域技术人员将认识到表达载体的设计可以取决于

如待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等这样的因素。本发明的表达载体可以引入宿主细胞中,由此产生由本文中所述的核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽。

[0148] 本发明进一步提供制备多肽的方法。可以利用各种其他表达/宿主系统。可以通过常规转化或转染技术将载体 DNA 引入原核或真核系统中。这些系统包括但不限于用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的微生物,如细菌(例如,大肠杆菌);用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)转染的或用细菌表达载体(例如, Ti 或 pBR332 质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。重组蛋白产生中有用的哺乳动物细胞包括但不限于 VERO 细胞、HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系或其衍生物,如 Veggie CHO 和生长在无血清培养基中的相关细胞系(参见 Rasmussen 等,1998, Cytotechnology 28:31)或 CHO 株 DX-B11,其是 DHFR 缺陷的(参见 Urlaub 等,1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20),COS 细胞,如猴肾细胞的 COS-7 系(ATCC CRL 1651)(参见 Gluzman 等,1981, Cell 23:175)、W138、BHK、HepG2、3T3(ATCC CCL 163)、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、L 细胞、C127 细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、源自非洲绿猴肾细胞系 CV1(ATCC CCL 70)的 CV1/EBNA(参见,McMahan 等,1991,EMBO J. 10:2821),人胚胎肾细胞如 293、293EBNA 或 MSR 203,人表皮 A431 细胞,人 Colo205 细胞,其他转化的灵长类细胞系,正常的二倍体细胞,源自原代组织、原代外植体的体外培养物的细胞株,HL-60、U937、HaK 或 Jurkat 细胞。哺乳动物表达允许分泌的或可溶性的多肽表达,其可以从生长培养基收集。

[0149] 对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知根据所用的表达载体和转染技术,只有少部分的细胞可以将外源 DNA 整合至其基因组中。为了鉴别和选择这些整合体,通常将编码选择标记的基因(例如,用于抗生素抗性)与目标基因一起引入宿主细胞中。一旦这样的细胞被含有选择标记以及所需表达盒的载体转化,细胞可以允许例如在转换到选择培养基之前在富集培养基中生长。设计选择标记以允许成功表达引入序列的细胞生长和回收。可以使用适用于所用细胞系的组织培养技术来增殖稳定转化细胞的抗性丛。重组蛋白表达的综述可以在 Methods of Enzymology(酶学方法), v. 185, Goeddel, D. V. 编辑, Academic Press 中找到。优选的选择标记包括赋予对药物如 G418、潮霉素和氨甲喋呤的抗性的那些。特别地,可以通过药物选择来鉴别用引入的核酸稳定转染的细胞(例如,已经整合选择标记基因的细胞将存活,而其他细胞死亡)。

[0150] 在一些情况中,如在使用原核系统的表达中,表达的本发明的多肽可能需要“重折叠”并氧化成适当的三级结构并产生二硫键以成为生物活性的。可以使用本领域公知的多种程序来完成重折叠。这样的方法包括例如在离液剂的存在下,将溶解的多肽暴露于通常高于 7 的 pH。离液剂的选择与用于包涵体溶解的选择相似;然而,离液剂通常以较低浓度使用。示例性离液剂是胍和脲。在大部分情况中,重折叠/氧化溶液还将含有特定比例的还原剂加其氧化形式,以产生特定的氧化还原电位,其允许发生二硫化物改组而用于半胱氨酸桥的形成。一些常用的氧化还原对包括半胱氨酸/胱胺、谷胱甘肽/二硫双 GSH、氯化铜、二硫苏糖醇 DTT/二噻烷 DTT 和 2-巯基乙醇(bME)/二硫-bME。在许多情况中,可以使用助溶剂来提高重折叠的效率。常用的助溶剂包括甘油、各种分子量的聚乙二醇和精氨酸。

[0151] 此外,可以根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成多肽。各种自动化合成仪是商业上可购得的并且可以根据已知方案来使用。参见,例如,Stewart 和 Young, Solid

Phase Peptide Synthesis(固相肽合成),第2版,Pierce Chemical Co.(1984);Tam等,J Am Chem Soc,105:6442(1983);Merrifield, Science 232:341-347(1986);Barany和Merrifield, The Peptides(肽),Gross和Meienhofer编辑,Academic Press, New York, 1-284;Barany等, Int J Pep Protein Res, 30:705-739(1987)。

[0152] 可以根据本领域技术人员公知的蛋白质纯化技术来纯化本发明的多肽和蛋白质。这些技术在一个水平上涉及蛋白质性和非蛋白质性级分的粗分级。将肽、多肽与其他蛋白质分离后,可以使用色谱和电泳技术进一步纯化目标肽或多肽以实现部分或完全纯化(或纯化至同质性)。如本文中使用的术语“纯化的多肽”用来指可与其他组分分离的组合物,其中多肽纯化至相对于其天然可获得状态的任何程度。因此,纯化的多肽还指没有其在其中天然产生的环境的多肽。通常,“纯化的”将指已经接受分级来除去各种其他组分的多肽组合物,且该组合物基本上保持其表达的生物活性。术语“基本上纯化的”所使用的环境中,这一表述将指其中多肽或肽形成组合物的主要组分的肽或多肽组合物,如构成组合物中蛋白质的约50%、约60%、约70%、约80%、约85%或约90%或更多。

[0153] 适用于纯化的各种技术是本领域技术人员公知的。这些包括,例如,硫酸铵沉淀、PEG、抗体(免疫沉淀)等或通过热变性,接着离心;色谱如亲和色谱(蛋白A柱)、离子交换、凝胶过滤、反相、羟磷灰石、疏水性相互作用色谱、等电聚焦、凝胶电泳以及这些技术的组合。如本领域通常已知的,据信进行各种纯化步骤的顺序可以改变,或可以省略特定的步骤,且仍然获得合适的用于制备基本上纯化的多肽的方法。以下实施例中提供了示例性纯化步骤。

[0154] 用于定量多肽纯化程度的各种方法将是本领域技术人员根据本发明公开内容可知的。这些包括,例如,测定活性部分的特异性结合活性或通过 SDS/PAGE 分析评估级分内的肽或多肽的量。评估多肽级分纯度的优选方法是计算级分的结合活性,将其与初始提取物的结合活性进行比较,并由此计算纯化程度,本文中通过“-纯化倍数”来评估。当然,用于表示结合活性量的实际单位将取决于选择来进行纯化的特定试验技术,并且不管多肽或肽是否呈现出可检测的结合活性。

#### [0155] 抗激活素A抗体

[0156] 可以通过使用肝素 HP 柱,采用盐梯度的宿主细胞培养物流体的过滤上清液的洗脱,从通过编码激活素A的基因转染的宿主细胞纯化激活素A。

[0157] 术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白,或其结合片段。抗体可以包含完整的抗体分子(包括具有全长重链和/或轻链的多克隆、单克隆、嵌合、人源化或人形式),或包含其抗原结合片段。抗体片段包括 F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、Fv、Fc 和 Fd 片段,并且可以结合至单域抗体、单链抗体、maxibodies、minobodies、胞内抗体(intrabodies)、双特异性抗体(diabody)、三特异性抗体、四特异性抗体、v-NAR 和双-scFv 中(参见,例如,Hollinger 和 Hudson, 2005, Nature Biotech., 23, 9, 1126-1136)。

[0158] Fab 片段是具有 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub> 和 C<sub>H1</sub> 结构域的单价片段;F(ab')<sub>2</sub> 片段是具有通过铰链区的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段;Fd 片段具有 V<sub>H</sub> 和 C<sub>H1</sub> 结构域;Fv 片段具有抗体单臂的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域;和 dAb 片段具有 V<sub>H</sub> 结构域、V<sub>L</sub> 结构域或者 V<sub>H</sub> 或 V<sub>L</sub> 结构域的抗原结合片段(美国专利 No. 6,846,634、6,696,245,美国申请公开 No. 05/0202512、04/0202995、04/0038291、04/0009507、03/0039958, Ward 等, Nature 341:544-546, 1989)。

[0159] 以下描述特定的轻链和重链可变结构域的多核苷酸和多肽序列。通过将轻链的名称结合重链可变结构域的名称来命名包含轻链和重链的抗体。例如,“L4H7”表示包含 L4 的轻链可变结构域和 H7 的重链可变结构域的抗体。

[0160]  $\kappa$  轻链恒定区序列显示于 SIQ ID NO:84、100 和 108 中,而重链恒定区序列显示于 SIQ ID NO:214、215 和 221 中。编码这些序列的多核苷酸对于轻链分别显示于 SIQ ID NO:222、223 和 239 中,和对于重链分别显示于 SIQ ID NO:240、241 和 242 中。因此,除了本文中公开的可变序列,抗体可以包含 SIQ ID NO:84 和 214 ;或 SIQ ID NO:215 和 223 ;或 SIQ ID NO:108 和 221 中的一个或两个。这些序列显示于下表中:

[0161]

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 84	Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys

[0162]

	Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
SEQ ID NO: 100	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
SEQ ID NO: 108	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
SEQ ID NO: 214	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

[0163]



	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
SEQ ID NO: 215	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
SEQ ID NO: 221	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0164]

	<p>Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe                  Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys                  Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg                  Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn                  Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro                  Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro                  Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu                  Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys                  Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn                  Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met                  Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr                  Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser                  Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln                  Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys</p>
<p>SEQ ID NO: 222</p>	<p>ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcaact ctgttcccge cctcctetga                  ggagettcaa gcaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct                  acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag                  gcgggagtgg agaccaccac acctccaaa caaagcaaca acaagtacgc                  ggccagcagc tatctgagcc tgacgectga gcagtggaag tcccacagaa                  gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcacctgga gaagacagtg                  gccctacag aatgtca</p>
<p>SEQ ID NO: 223</p>	<p>cgaactgtgg etgcaccate tgtcttate tcccgccat ctgatgagca                  gttgaaatct ggaactgct ctgtgtgtg cctgetgaat aactctate                  ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccct ccaatcggt                  aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag                  cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag aacacaaaag                  tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctgccc cgtcacaag                  agctcaaca ggggagagtg t</p>
<p>SEQ ID NO: 239</p>	<p>cgaactgtgg etgcaccate tgtcttate tcccgccat ctgatgagca                  gttgaaatct ggaactgct ctgtgtgtg cctgetgaat aactctate                  ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccct ccaatcggt                  aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag                  cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag aacacaaaag                  tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctgccc cgtcacaag                  agctcaaca ggggagagtg t</p>
<p>SEQ ID NO: 240</p>	<p>gctccacca agggcccatc ggtcttccc ctggcgccct gctccaggag                  caactecgag agcacagcgg cctgggctg cctggtaag gactactec                  ccgaaccggt gacgggtgtg tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg                  cacaccttcc cagctgtct acagctctca ggaacttaact cctcagcag                  cgtggtgacc gtgceetcca geaactfeg caccagacc tacacctga</p>

[0165]

	<p>acgtagatca caagcccage aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc  aaatgttggtg tcgagtgecc accgtgcccga geaccacctg tggcaggacc  gtcagtette ctcttecccc caaaacecaa ggacaccctc atgatctccc  ggaccctga ggtcacgtgc gtgggtggagg acgtgagcca cgaagacccc  gaggteccagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcca  gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt gtggtcagcg  tctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc  aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctcca  aaccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg cccccatccc  gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgect ggtaaaagge  ttctacecca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga  gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac ggtctctct  tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac  gtctctcat gctcctgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacga  gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa</p>
<p>SEQ ID NO: 241</p>	<p>gctccacca agggcccate ggtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag  caectecgag agcacagegg cectgggctg cctggtaag gactactec  ccgaaccggt gacgggtgctg tggaactcag gcctctgac cagcggcgtg  cacacttcc cagctgtct acagctctca ggactctact cctcagcag  cgtggtgacc gtgectcca geaactcgg caeccagacc tacactgca  acgtagatca caagcccage aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc  aaatgttggtg tcgagtgecc accgtgcccga geaccacctg tggcaggacc  gtcagtette ctcttecccc caaaacecaa ggacaccctc atgatctccc  ggaccctga ggtcacgtgc gtgggtggagg acgtgagcca cgaagacccc  gaggteccagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcca  gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt gtggtcagcg  tctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc  aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctcca  aaccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg cccccatccc  gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgect ggtaaaagge  ttctacecca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga  gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac ggtctctct  tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac  gtctctcat gctcctgat geatgaggt ctgcacaacc actacacga  gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa</p>
<p>SEQ ID NO: 242</p>	<p>gctccacca agggcccate ggtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag  caectecgag agcacagegg cectgggctg cctggtaag gactactec  ccgaaccggt gacgggtgctg tggaactcag gcctctgac cagcggcgtg  cacacttcc cagctgtct acagctctca ggactctact cctcagcag  cgtggtgacc gtgectcca geaactcgg caeccagacc tacactgca</p>

[0166]

```

acgtagatca caagcccage aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc
aaatgttggtg tcgagtgecc accgtgecca geaccacctg tggcaggacc
gtcagtcttc ctctccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc
ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc
gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccc
gacaaagcca cgggaggage agttcaacag cacgttccgt gtggtcageg
tctcaccgt tgtgcaccag gactggetga acggcaagga gtacaagtgc
aaggtetcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccctctccaa
aaccaaaggg cagecccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc
gggaggagat gaccaagaac caggteagcc tgacctgect ggtaaagggc
ttctaccca gcgacategc cgtggagtgg gagagcaatg ggcageccga
gaacaactac aagaccacac ctcc

```

[0167] 在其他实施方案中，抗体可以包含特定的重链或轻链，同时互补的轻链或重链可变结构域保持未指明。特别地，本文中的特定实施方案包括通过特定轻链或重链结合特定抗原（如激活素 A）的抗体以使得互补重链或轻链可以是混杂的，或甚至是无关的，但可以通过例如筛选组合文库来确定。Portolano 等, *J. Immunol.* V. 150(3), pp. 880-887(1993) ; Clackson 等, *Nature* v. 352pp. 624-628(1991)。

[0168] 天然产生的免疫球蛋白链呈现由三个超变区（也称为互补决定区或 CDR）连接的相对保守的框架区（FR）的相同一般结构。从 N- 端至 C- 端，轻链和重链都包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。根据 Kabat 等在 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991 中的定义将氨基酸分配到每个结构域。

[0169] 术语“人抗体”，也称为“全人抗体”，包括具有一个或多个源自人免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的所有抗体。在一个实施方案中，所有可变结构域和恒定结构域源自人免疫球蛋白序列（全人抗体）。这些抗体可以以多种方式来制备，其实例描述于下文中，包括通过用目标抗原免疫遗传修饰的小鼠来表达源自人重链和 / 或轻链编码基因的抗体。

[0170] 人源化抗体具有与源自非人物种的抗体的序列相差一个或多个氨基酸置换、删除和 / 或添加的序列，使得当施用于人受试者时，与非人物种抗体相比，人源化抗体较少可能诱导免疫反应，和 / 或诱导不太严重的免疫反应。在一个实施方案中，非人物种抗体的重链和 / 或轻链的框架和恒定结构域中的特定氨基酸突变以产生人源化抗体。在另一个实施方案中，来自人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域融合。在另一个实施方案中，改变非人抗体的一个或多个 CDR 序列中的一个或多个氨基酸残基以降低施用于人受试者时非人抗体可能的致免疫性，其中改变的氨基酸残基对于抗体与其抗原的免疫特异性结合不是关键的，或者所进行的氨基酸序列的改变是保守性改变，使得人源化抗体与抗原的结合不明显差于非人抗体与抗原的结合。如何制备人源化抗体的实例可以在美国专利 No. 6, 054, 297、5, 886, 152 和 5, 877, 293 中找到。

[0171] 术语“嵌合抗体”是指含有一个或多个来自一个抗体的区域和一个或多个来自一个或多个其他抗体的区域的抗体。在一个实施方案中，一个或多个 CDR 源自人抗激活素 A 抗体。在另一个实施方案中，全部 CDR 源自人抗激活 A 抗体。在另一个实施方案中，将来自超

过一个人抗激活素 A 抗体的 CDR 在嵌合抗体中混合并匹配。例如,嵌合抗体可以包含来自第一人抗激活素 A 抗体的轻链的 CDR1、来自第二人抗激活素 A 抗体的轻链的 CDR2 和 CDR3,和来自第三抗激活素 A 抗体的重链的 CDR。此外,框架区可以源自相同的抗激活素 A 抗体之一,源自一个或多个不同的抗体如人抗体,或源自人源化抗体。在嵌合抗体的一个实例中,重链和 / 或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体相同、同源或源自该抗体,同时链的其余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体相同、同源或源自该抗体。还包括呈现出所需生物活性(即,特异性结合激活素 A 的能力)的此类抗体的片段。

[0172] 本领域普通技术人员按照本说明书的教导并使用本领域公知的技术,可以容易地制备抗体的片段或类似物。优选的片段或类似物的氨基 - 和羧基 - 末端出现在功能结构域边界附近。可以通过将核苷酸和 / 或氨基酸序列数据与公众或专有序列数据库进行比较来鉴别结构和功能结构域。可以使用计算机化比较方法来鉴别序列基序或已知结构和 / 或功能的其他蛋白质中出现的预测蛋白质构象结构域。鉴别折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。参见,例如, Bowie 等, 1991, *Science* 253:164。

[0173] 例如,通过抗体的蛋白水解,例如,根据常规方法的完整抗体的胃蛋白酶和木瓜蛋白酶消化,可以获得源自抗体的抗原结合片段。例如,可以通过用胃蛋白酶酶促切割抗体来产生抗体片段以提供称为  $F(ab')_2$  的 5S 片段。可以使用硫醇还原剂进一步切割该片段以产生 3.5S Fab' 单价片段。任选地,可以使用针对从二硫键的切割得到的巯基的封闭基团来进行切割反应。作为替代方案,使用木瓜蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价 Fab 片段和 Fc 片段。这些方法描述于,例如, Goldenberg, 美国专利 No. 4, 331, 647, Nisonoff 等, *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960 ; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959 ; Edelman 等, *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967) ; 以及 Andrews, S. M. 和 Titus, J. A., *Current Protocols in Immunology* (Coligan J. E 等编辑), John Wiley & Sons, New York (2003), 第 2.8.1-2.8.10 和 2.10A.1-2.10A.5 页。还可以使用用于切割抗体的其他方法,如分离重链以形成单价轻 - 重链片段 (Fd)、片段的进一步切割、或其他酶、化学或遗传技术,只要片段结合完整抗体识别的抗原。

[0174] 抗体片段还可以是任何合成的或遗传工程化的蛋白质。例如,抗体片段包括由轻链可变区组成的分离片段、由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段、其中轻链和重链可变区由肽接头连接的重组单链多肽分子 (scFv 蛋白质)。

[0175] 抗体片段的另一形式是包含抗体的一个或多个互补决定区 (CDR) 的肽。CDR (也称为“最小识别单位”或“超变区”)可以共价或非共价地结合至分子中以使其成为抗原结合蛋白。可以通过构建编码目标 CDR 的多核苷酸来获得 CDR。例如,使用抗体产生细胞的 mRNA 作为模板,通过使用聚合酶链式反应以合成可变区来制得这样的多核苷酸 (参见,例如, Larrick 等, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991 ; Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”, 在 *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter 等 (编辑), 第 166 页 (Cambridge University Press 1995) ; 和 Ward 等, “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”, 在 *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch 等 (编辑), 第 137 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995))。

[0176] 因此,在一个实施方案中,结合剂包含至少一个如本文中所述的 CDR。结合剂可以包含至少两个、三个、四个、五个或六个如本文中所述的 CDR。结合剂可以进一步包含本文中所述抗体的至少一个可变结构域。可变结构域可以是任何大小或氨基酸组成,并且通常将包含至少一个负责结合人激活素 A 的 CDR 序列,例如本文中具体描述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 和 / 或轻链 CDR,并且其邻近一个或多个框架序列或与一个或多个框架序列同框。概括地,可变 (V) 区结构域可以是免疫球蛋白重链 ( $V_H$ ) 和 / 或轻链 ( $V_L$ ) 可变结构域的任何合适的排列。因此,例如,V 区结构域可以是单体的并且可以是  $V_H$  或  $V_L$  结构域,其能够以至少等于  $1 \times 10^{-7} M$  或更低的亲和性独立地结合人激活素 A,如以下所述的。或者,V 区结构域可以是二聚的,并且含有  $V_H$ - $V_H$ 、 $V_H$ - $V_L$  或  $V_L$ - $V_L$  二聚体。V 区二聚体包含可以是非共价连接的至少一个  $V_H$  和至少一个  $V_L$  链(下文中称为 Fv)。如果需要,链可以是直接地共价偶联,例如,通过两个可变结构域之间的二硫键,或通过接头(例如肽接头)偶联以形成单链 Fv(scFv)。

[0177] 可变结构域可以是任何天然产生的可变结构域或其工程化形式。工程化形式意思是已经使用重组 DNA 工程化技术形成的可变结构域。这样的工程化形式包括例如通过特定抗体的氨基酸序列的插入、删除或改变从特定的抗体可变区形成的那些。特别的实例包括含有来自第一抗体的至少一个 CDR 和任选一个或多个框架氨基酸以及来自第二抗体的可变结构域的剩余部分的工程化可变结构域。

[0178] 可变结构域可以在 C- 端氨基酸共价连接至少一个其他抗体结构域或其片段。因此,例如,可变结构域中存在的 VH 结构域可以连接免疫球蛋白 CH1 结构域,或其片段。相似地, $V_L$  结构域可以连接  $C_k$  结构域或其片段。这样,例如,抗体可以是 Fab 片段,其中抗原结合结构域含有在其 C- 端分别共价连接 CH1 和  $C_k$  结构域的相关  $V_H$  和  $V_L$  结构域。可以用另外的氨基酸来延长 CH1 结构域,例如,以提供如在 Fab' 片段中发现的铰链区或铰链区结构域的一部分,或提供另外的结构域,如抗体 CH2 和 CH3 结构域。

[0179] 如本文中所述的,抗体包含这些 CDR 中的至少一个。例如,可以将一个或多个 CDR 结合至已知抗体框架区中(IgG1、IgG2 等),或与合适的载体偶联以增强其半衰期。合适的载体包括,但不限于 Fc、聚乙二醇(PEG)、白蛋白、转铁蛋白等。这些和其他合适的载体是本领域已知的。这样的偶联 CDR 肽可以是单体的、二聚的、三聚的或其他形式。在一个实施方案中,一个或多个水溶性聚合物在结合剂的一个或多个特定位置(例如,在氨基端)键合。

[0180] 可以通过使用特定的 VL 或 VH 结构域来筛选互补可变结构域的文库,通过本领域已知的方法来产生抗原特异性(即,激活素 A 特异性)抗体。这样的产生抗体的方法是本领域已知的。例如,与另一种蛋白质(如较小的外壳蛋白)融合的抗体片段可以用于使用抗原富集噬菌体。然后,使用来自小鼠对抗原(例如,激活素 A)的免疫的重排重链(VH)和轻链(VL)的随机组合文库,在噬菌体表面上展示抗体片段的不同文库。可以筛选这些文库的互补可变结构域,并且通过例如亲和柱纯化结构域。参见,Clackson 等, Nature, V. 352pp. 624-628(1991)。

[0181] 在另一个实例中,来自抗体(即,激活素 A 抗体)的单独 VL 或 VH 链可以用于搜寻可以形成具有相同特异性的抗原结合片段(或 Fab)的其他 VH 或 VL 链。因此,VH 和 VL 链 Ig 基因的随机组合可以在噬菌体文库(如 fd 或  $\lambda$  噬菌体)中表达为抗原结合片段。例如,可以通过利用分别与抗原结合特异性 VL 或 VH 链组合的亲本 VL 或 VH 链文库来产生组合文库。然后通过常规技术,例如通过使用放射性标记的探针(如放射性标记的激活素 A),

来筛选组合文库。参见,例如,Portolano 等, *J. Immunol.* V. 150 (3) pp. 880-887 (1993)。

[0182] “CDR 嫁接的抗体”是包含源自特定物种或同种型的抗体的一个或多个 CDR 和相同或不同物种或同种型的另一抗体的框架的抗体。

[0183] “多特异性抗体”是识别一个或多个抗原上的超过一个表位的抗体。这种类型的抗体的亚类是“双特异性抗体”,其识别相同或不同抗原上的两个不同的表位。

[0184] “抗原结合结构域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是含有与抗原相互作用的氨基酸残基(或其他部分)并且造成抗原结合蛋白对抗原的特异性和亲和性的抗原结合蛋白的一部分。对于特异性结合其抗原的抗体,这将至少包括其至少一个 CDR 结构域的部分。

[0185] “表位”是被抗原结合蛋白(例如,被抗体)结合的分子的部分。表位可以包含分子的非邻接部分(例如,在多肽中,多肽初级序列中不邻接的氨基酸残基,但在多肽的三级和四级结构的情况中,彼此足够接近以被抗原结合蛋白结合),并且包括所示的末端序列氨基酸。例如,多肽序列 R13-Y39 包括氨基酸 R13 和 Y39,以及序列中 R13 和 Y39 之间发现的氨基酸。在其中表位包含分子的非邻接部分的实施方案中,因此该序列将标注。

#### [0186] 抗原结合蛋白

[0187] 在一个方面中,本发明提供了结合激活素 A(例如,人激活素 A)的抗原结合蛋白(例如,抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体突变蛋白和抗体变体)。

[0188] “抗原结合蛋白”是包含结合抗原的部分和任选允许抗原结合部分采用促进抗原结合蛋白与抗原结合的构象的支架或框架部分的蛋白。抗原结合蛋白的实例包括抗体、抗体片段(例如,抗体的抗原结合部分)、抗体衍生物和抗体类似物。抗原结合蛋白可以包含,例如,具有嫁接的 CDR 或 CDR 衍生物的可选蛋白支架或人工支架。这样的支架包括,但不限于,包含引入的突变以例如稳定抗原结合蛋白三维结构的抗体衍生的支架,以及包含例如生物相容性聚合物的完全合成的支架。参见,例如, Korndorfer 等, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque 等, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654。此外,可以使用肽抗体模拟物(“PAM”),以及基于利用纤连蛋白组分作为支架的抗体模拟物的支架。

[0189] 抗原结合蛋白可以具有,例如,天然产生的免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是四聚分子。在天然产生的免疫球蛋白中,每个四聚体由两个相同的多肽链对组成,每个对具有一个“轻”链(约 25kDa)和一个“重”链(约 50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括约 100 至 110 或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。每条链的羧基端部分限定恒定区,其主要负责效应子功能。人轻链分类为  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链。重链分类为  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$  或  $\epsilon$ ,并将抗体的同种型分别限定为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约 10 个或更多个氨基酸的“D”区。通常参见, *Fundamental Immunology*(基础免疫学),第 7 章(Paul, W. 等,第 2 版, Raven Press, N. Y. (1989))(将其全部按引用并入用于所有目的)。每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点,使得完整的免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0190] 根据本发明的抗原结合蛋白包括抑制激活素 A 的生物活性的抗原结合蛋白。例如,抗原结合蛋白可以减弱恶病质,并且在抗原结合蛋白是完全人的时,如全人抗体,可以呈现这种活性。

[0191] 不同的抗原结合蛋白可以结合激活素 A 的不同结构域或半胱氨酸结构域或

通过不同的作用机理起作用。实例包括但不限于特异性结合一个或多个特定半胱氨酸结构域的抗原结合蛋白,或分散在二硫键之间的区域,包括跨越以下序列的约氨基酸 4-12、氨基酸 11-81、氨基酸 11-33、氨基酸 13-39、氨基酸 40-113、氨基酸 44-115、氨基酸 81-111 和 / 或氨基酸 82-107 的区域:tcctatgagg tgactcagge accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttggt ggtatcagca gaagccagge cagtcccctg tgctggcat ctatcaagat agcaagcggc cctcaggat ccctgagcga ttctctggct ccaactctgg aacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg accaagctga ccgtccta(SEQ ID NO:267)。如本文中特别描述的,结构域区域命名为使得包括该基团,除非另外指出。例如,氨基酸 4-12 是指九个氨基酸:位置 4 和 12 的氨基酸,以及序列中的七个插入氨基酸。其他实例包括抑制激活素 A 与其受体结合的抗原结合蛋白。抗原结合蛋白不需要完全抑制激活素 A 诱导的活性以在本发明中具有用途;相反,还考虑了降低激活素 A 的特定活性的抗原结合蛋白的使用。(本文中针对激活素 A 结合抗原结合蛋白在治疗特定疾病中的特定作用机理的讨论只是说明性的,并且本文中呈现的方法因此也不受局限)。

[0192] 在另一个方面中,本发明提供了包含选自 A1-A14 的轻链可变区或选自 A1-A14 的重链可变区的抗原结合蛋白,及其片段、衍生物、突变蛋白和变体。这样的抗原结合蛋白可以使用命名法“LxHy”来命名,其中“x”对应于轻链可变区的编号,而“y”对应于重链可变区的编号,如以下序列中标记的。也就是说,例如,“A1HC”表示抗体 A1 的重链可变区;“A1LC”表示抗体 A1 的轻链可变区,等等。更概括地讲,“L2H1”是指具有包含 L2 的氨基酸序列的轻链可变区和包含 H1 的氨基酸序列的重链可变区的抗原结合蛋白。为了简明起见,通过一组的至少两个成员表示的所有范围包括该组之间的所有成员并且包括末端范围成员。因此,组范围 A1-A14 包括 A1 和 A14 之间的所有成员,以及成员 A1 和 A14 自身。组范围 A4-A6 包括成员 A4、A5 和 A6,等。

[0193] 以下还显示了形成抗原结合位点的部分的 CDR 的位置(下划线的),而框架区(FR)是这些可变结构域序列的插入区段。在轻链可变区和重链可变区中,都存在三个 CDR(CDR1-3)和四个 FR(FR1-4)。每个轻链和重链的 CDR 区还可以通过抗体类型(A1、A2、A3 等)来分组。本发明的抗原结合蛋白包括,例如,具有选自 L1H1(抗体 A1)、L2H2(抗体 A2)、L3H3(抗体 A3)、L4H4(抗体 A4)、L5H5(抗体 A5)、L6H6(抗体 A6)、L7H7(抗体 A7)、L8H8(抗体 A8)、L9H9(抗体 A9)、L10H10(抗体 A10)、L11H11(抗体 A11)、L12H12(抗体 A12)、L13H13(抗体 A13)和 L14H14(抗体 A14)组成的组合组的轻链和重链可变结构域组合的抗原结合蛋白。

[0194] 抗体 A1-A14 重链和轻链可变区多核苷酸(本文中也称为 H1-H14 和 L1-L14)。

[0195] A1 HC

[0196] CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGTTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG GGATGGATCATCCCTTACAATGGTAACACAACTCTGCACAGAACTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACA CATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGAC AGGGACTACGGTGTCAATTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:268)



[0197] A1 LC

[0198] TCCTATGAGGTGACTCAGGCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCT  
GGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCA  
AGATAGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGAAAACACAGCCACTCTGACCATCA  
GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGCGGTATTCGGCGGAGGG  
ACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:267)

[0199] A2 HC

[0200] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTACGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATT  
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGTCGG  
AACTGGAACTACGACAACTACTACTACGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ  
ID NO:269)

[0201] A2 LC

[0202] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAAATAATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATTTA  
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACA  
TCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTACAACCTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAA (SEQ ID NO:270)

[0203] A3 HC

[0204] GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGCCTGG  
CCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC  
GCCAAGAATTCACTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTAG  
CAGCAGCTGGTACTACTACAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID  
NO:271)

[0205] A3 LC

[0206] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTA  
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACA  
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACCTATTACTGTCGACAGCAAAATACTTACCCGCTCACTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGAGATCAAAA (SEQ ID NO:272)

[0207] A4 HC

[0208] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA  
GGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATCCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG  
GGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACA  
CGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTTCTGTGCGAGAG  
ATTCGGGGTATAGCAGCAGCTGGCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID  
NO:273)

[0209] A4 LC

[0210] GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC  
AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTACTGGATACAACACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC  
ACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTTTTCGGGCCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGCACAG  
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTCCAAACTCCG  
TGCAGTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:274)

[0211] A5 HC

[0212] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT  
GTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTCTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG  
GTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA  
AGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGTGCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACAGTATA  
GCAGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTT  
CCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG  
AACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCATGCGCCCT (SEQ ID NO:66)

[0213] A5 LC

[0214] GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCACCTGC  
AAGTCCAGCCAGAGTATTTTATACAGTTCCAACAATAAGAAGTATCTAGTTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC  
TCCTAAGCTGATCATTACTGGACATCTATGCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGA  
CAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT  
CCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:65)

[0215] A6 HC

[0216] CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCT  
GTCTATGGTGGGTCTTCAGTGCTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG  
GGAATCAATCATAGTGGAGGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA  
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTACAGTGG  
CTCGAACTGGCCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:82)

[0217] A6 LC

[0218] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA  
TGCTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA  
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTAAAGTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATTTGCCCCACTTTGCGCGGC  
GGGACCAAGGTGGAGAACAAA (SEQ ID NO:81)

[0219] A7 HC

[0220] CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTCACTTCATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATCTGGTATGATGGAAGTACTGAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT  
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGG  
CAGTGGCTCTACCACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:98)

[0221] A7 LC

[0222] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAGGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGTCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTA  
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACA  
 TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTTACAACATAATACTTACCCATTCACTTTCGGCCCT  
 GGGACCAAAGTGGATATCAAA (SEQ ID NO:97)

[0223] A8 HC

[0224] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT  
 GTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTTCTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG  
 GTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGGCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA  
 AGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACAGTATA  
GCAGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:114)

[0225] A8 LC

[0226] GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCACCTGC  
AAGTCCAGCCAGAGTATTTTATACAGCTCCAACAATAAGAAGTATCTAGTTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC  
 TCCTAAGTTGATCATTACTGGACATCTATGCGGGAAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGA  
 CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT  
CCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:113)

[0227] A9 HC

[0228] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
 GCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTACGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG  
 CAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT  
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGTCG  
GAACTGGAACTACGACAATACTACTACGGTCTGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ  
 ID NO:130)

[0229] A9 LC

[0230] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATAATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATTTA  
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACA  
 TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTACAACCTTATTACTGTTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
 GGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:129)

[0231] A10 HC

[0232] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTGAG  
 GGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG  
GATCATCTATCCTGGTACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCCTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT  
 CCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAGGA  
CTGGGGTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:146)

[0233] A10 LC

[0234] TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCT  
GGAGAAAAATGGGGAGAGAAATATGCTTGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCA

AGATACCAAGCGGCCCTCCGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCATTTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTATTGTCAGGCGTGGGACAGGAGCACTGTATTCGGCGGAGGGACC  
AAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:145)

[0235] A11 HC

[0236] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCAC  
TGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAG  
TGGATTGGGTACATCTCTTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTTG  
ACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGC  
GCGCTTACGGTGACTATCGCGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID  
NO:162)

[0237] A11 LC

[0238] TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCT  
GGAGATAAATTGGGGGATAAATTTGCTTTCTGGTATCAGCTGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCA  
AGATAACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
GCGGGACCCAGGCTATGGATGCGGCTGACTTTTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGG  
ACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:161)

[0239] A12 HL

[0240] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTGCCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG  
CAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAAT  
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGTCG  
GAACTGGAACTACGACTCCTACCAATACGGTTTTGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ  
ID NO:178)

[0241] A12 LC

[0242] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTA  
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAA  
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTGTGCAACTATTATTGTCTACAGCATAATAGTTATACGTGGACGTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAA (SEQ ID NO:177)

[0243] A13 HC

[0244] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA  
GGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGAGGATG  
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACA  
CATCAACGACCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG  
ATCAAGATTACTATGATAGTAGTGGTTGGGGCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID  
NO:194)

[0245] A13 LC

[0246] TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCT  
GGAGATAAATTGGGGGATAAATATGTTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGAACTGGTCATCTATCT

AGATAACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACGGTATTCGGCGGAGGGACC  
AAACTGACCGTCCTG (SEQ ID NO:193)

[0247] A14 HC

[0248] CAGGTTCAGCTGGTGCAATCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA  
GACTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG  
GGATGGATCAGCCCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACA  
AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGCGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG  
ATCAAGATTACTATGATAGTAGTGGTTGGGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID  
NO:210)

[0249] A14LC

[0250] TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCGGTGTCCCCAGGACAGACAGCCTCCATCACCTGCTCT  
GGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTTCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCTTCTATCA  
TGATACCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATCACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACGGTCTTCGGCGGAGGGACC  
AAGCTGACCGTCCTAC (SEQ ID NO:209)

[0251] 抗体 A1-A14 氨基酸序列,轻链可变区。CDR 区域是下划线的;插入区段或区域在  
本文中称为框架 (FR)。

[0252] A1

[0253] SYEVTQAPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:275)

[0254] A2

[0255] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNNLGWYQQKPGKAPKRLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDFTTYCLQHNSYPWTFGGTKVEIK (SEQ ID NO:276)

[0256] A3

[0257] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDFATYYCCRQNTYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:277)

[0258] A4

[0259] DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSTGYNLWDWYLQKPGQSPQLLIYLGSFRASGVPDRFSG  
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPCSFGGTKLEIK (SEQ ID NO:57)

[0260] A5

[0261] DIVMTQSPDSLAVSLGERATITCKSSQSILYSSNNKKYLWYQQKPGQPPKLIYWTSMRESGVPDRFS  
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCQYYSTPWTFGGTKVEIK (SEQ ID NO:73)

[0262] A6

[0263] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISNYLNWYQQRPKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFVSYYCQSYSISPTFGGGTKVENK (SEQ ID NO:89)

[0264] A7

[0265] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAGQGIRNDLVWYQQKPGKAPKRLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDFATYYCLQHNTYPFTFGGGTKVDIK (SEQ ID NO:105)

- [0266] A8
- [0267] DIVMTQSPDSLAVSLGERATITCKSSQSILYSSNNKKYLWYQQKPGQPPKLIYWTSMRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:121)
- [0268] A9
- [0269] DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQGI RNNLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDFTTYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:137)
- [0270] A10
- [0271] SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEKWGEKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDKRPSGIPERFSGSISGNT  
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRSTVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:153)
- [0272] A11
- [0273] SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQLKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISGTQAMDAADFYCQAWDSSTVVFSGGKTLTVL (SEQ ID NO:169)
- [0274] A12
- [0275] DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQGI RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDCATYYCLQHNSYTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:185)
- [0276] A13
- [0277] SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYLDNKRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFSGGKTLTVL (SEQ ID NO:201)
- [0278] A14
- [0279] SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAFWYQQKPGQSPVLVYHDKRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISGTQAMDEADYHCQAWDSSTVVFSGGKTLTVL (SEQ ID NO:217)
- [0280] 抗体A1-A14,重链可变区的氨基酸序列。CDR区是有阴影和下划线的;其他区域在本文中称为框架(FR)。
- [0281] A1
- [0282] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIIPYNGNTNSAQKLQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDRDYGVNYDAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:278)
- [0283] A2
- [0284] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYHADSVKGRFT  
ISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVRSRNWNVDNYYYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:279)
- [0285] A3
- [0286] EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLECVANIKQDGSEYYVDSVKGRFT  
ISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGSSSWYNYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:280)
- [0287] A4
- [0288] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT  
MTRDTSISTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDSGYSSSWHFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:58)
- [0289] A5
- [0290] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSFYWSWIRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRVTI  
SVDTSKIQFSLKLSVTAADTAVYYCARDSIAAPFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:74)
- [0291] A6

[0292] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGGTNYNPSLKSRVTI  
SVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVQWLELAYFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:90)

[0293] A7

[0294] QVQLVDSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSSTEYADSVKGRFT  
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERQWLYHYGMDVWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:106)

[0295] A8

[0296] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSINSFYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKRRVTI  
SVDTSKTFSLKLSVTAADTAVYYCARDIAAPFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:122)

[0297] A9

[0298] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYHADSVKGRFT  
ISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVRSRNWNVDNYYYGLDVWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:138)

[0299] A10

[0300] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYIPGDS TRYSPSFQGGVT  
ISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARQGLGFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:154)

[0301] A11

[0302] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYISYSGSTYYNPSLKSRV  
TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAYGDYRGWFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:170)

[0303] A12

[0304] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSAYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFI  
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSRNWNYSYQYGLDVWGQGTTLVTVSS (SEQ IDNO:186)

[0305] A13

[0306] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLERMGWISAYNGNTNYAQKFQGRVT  
MTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQDYDSSGWHWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:202)

[0307] A14

[0308] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPYNGNTNYAQKFQGRVT  
MTTDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQDYDSSGWDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:218)

[0309] 表 1 :抗体 A1-A14 的轻链 CDR1 共有序列。

[0310]

轻链	CDR1序列
L4	R S S Q S L L H S T G Y N - Y L D
L5, L8	K S S Q S I L Y S S N N K K Y L V
共有:	X <sub>1</sub> S S Q S X <sub>2</sub> L X <sub>3</sub> S X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> Y L X <sub>9</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 253, 75和115)
<p>X<sub>1</sub>是精氨酸残基或赖氨酸残基,                      X<sub>2</sub>是亮氨酸残基或异亮氨酸残基,                      X<sub>3</sub>是组氨酸残基或酪氨酸残基,                      X<sub>4</sub>是苏氨酸残基或丝氨酸残基,                      X<sub>5</sub>是甘氨酸残基或天冬酰胺残基,                      X<sub>6</sub>是酪氨酸残基或天冬酰胺残基,                      X<sub>7</sub>是天冬酰胺残基或赖氨酸残基,                      X<sub>8</sub>是赖氨酸残基或无残基,                      X<sub>9</sub>是天冬氨酸残基或缬氨酸残基,</p>	
L2, L9	R A S Q G I R N N L G
L3, L12	R A S Q G I R N D L G
L6	R A S Q S I S N Y L N
L7	R A G Q G I R N D L V
共有:	R A X <sub>10</sub> Q X <sub>11</sub> I X <sub>12</sub> N X <sub>13</sub> L X <sub>14</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 281-282, 91, 107和116)
<p>X<sub>10</sub>是丝氨酸残基或甘氨酸残基,                      X<sub>11</sub>是丝氨酸残基或甘氨酸残基,                      X<sub>12</sub>是丝氨酸残基或精氨酸残基,                      X<sub>13</sub>是酪氨酸残基、天冬氨酸残基或天冬酰胺残基                      X<sub>14</sub>是天冬酰胺残基、缬氨酸残基或甘氨酸残基</p>	
L1	S G D K L G D K Y A C

[0311]



L10	S G E K W G E K Y A C
L11	S G D K L G D K F A F
L13	S G D K L G D K Y V C
L14	S G D K L G D K Y A F
共有:	S G X <sub>15</sub> K X <sub>16</sub> G X <sub>17</sub> K X <sub>18</sub> X <sub>19</sub> X <sub>20</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 59, 155, 171, 203, 219和123)
<p>X<sub>15</sub>是谷氨酸残基或天冬氨酸残基,  X<sub>16</sub>是色氨酸残基或亮氨酸残基,  X<sub>17</sub>是谷氨酸残基或天冬氨酸残基,  X<sub>18</sub>是酪氨酸残基或苯丙氨酸残基,  X<sub>19</sub>是丙氨酸残基或缬氨酸残基,  X<sub>20</sub>是半胱氨酸残基或苯丙氨酸残基</p>	

[0312] 表 2 :抗体 A1-A14 的轻链 CDR2 共有序列

[0313]

轻链	CDR2序列
L2	A T S S L Q S
L3, L6, L7, L9, L12	A A S S L Q S
L5, L8	W T S M R E S
L4	L G S F R A S
共有:	X <sub>40</sub> X <sub>41</sub> S X <sub>42</sub> X <sub>43</sub> X <sub>44</sub> S (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 92, 283, 76, 254和124)
<p>X<sub>40</sub>是丙氨酸残基、色氨酸残基或亮氨酸残基,  X<sub>41</sub>是苏氨酸残基、丙氨酸残基或甘氨酸残基,  X<sub>42</sub>是丝氨酸残基、甲硫氨酸残基或苯丙氨酸残基,  X<sub>43</sub>是亮氨酸残基或精氨酸残基,  X<sub>44</sub>是谷氨酰胺残基、谷氨酸残基或丙氨酸残基</p>	
L10	Q D T K R P S

[0314]

L11	Q D N K R P S
L1	Q D S K R P S
L13	L D N K R P S
L14	H D T K R P S
共有：	X <sub>45</sub> D X <sub>46</sub> K R P S (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 156, 172, 60, 204, 220和128)
X <sub>45</sub> 是谷氨酰胺残基、亮氨酸残基或组氨酸残基， X <sub>46</sub> 是苏氨酸残基、天冬酰胺残基或丝氨酸残基	

[0315] 表 3 :抗体 A1-A14 的轻链 CDR3 共有序列

[0316]

轻链	CDR3序列
L1	Q A W D S S T A V
L10	Q A W D R S T - V
L11	Q A W D S S T V V
L13, L14	Q A W D S S T V -
L2	L Q H N S Y P W T
L7	L Q H N T Y P F T
L9	L Q H N S Y P W T
L12	L Q H N S Y T W T
共有:	L Q H N X <sub>81</sub> Y X <sub>82</sub> X <sub>83</sub> T (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 61, 157, 173, 205, 141, 109, 141, 189和131)
<p>X<sub>81</sub>是苏氨酸残基或丝氨酸残基,  X<sub>82</sub>是脯氨酸残基或苏氨酸残基,  X<sub>83</sub>是苯丙氨酸残基或色氨酸残基,</p>	
L3	R Q Q N T Y P L T
L4	M Q A L Q T P C S
L5	Q Q Y Y S T P W T

[0317]

L6	Q Q S Y S I S P T
L8	Q Q Y Y S T P W T
共有:	X <sub>73</sub> Q X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 284, 255, 77, 93, 125和132)
<p>X<sub>73</sub>是甲硫氨酸残基、谷氨酰胺残基或精氨酸残基,                  X<sub>74</sub>是丙氨酸残基、酪氨酸残基、谷氨酰胺残基或丝氨酸残基,                  X<sub>75</sub>是亮氨酸残基、酪氨酸残基或天冬酰胺残基,                  X<sub>76</sub>是谷氨酰胺残基、丝氨酸残基或苏氨酸残基,                  X<sub>77</sub>是苏氨酸残基、酪氨酸残基或异亮氨酸残基,                  X<sub>78</sub>是脯氨酸残基或丝氨酸残基,                  X<sub>79</sub>是半胱氨酸残基、色氨酸残基、亮氨酸残基或脯氨酸残基,                  X<sub>80</sub>是丝氨酸残基或苏氨酸残基</p>	

[0318] 表 4 :抗体 A1-A14 的重链 CDR1 共有序列。

[0319]

重链	CDR1序列
H5	G G S I N S - - F Y W S
H6	G G S F S A - - Y Y W S
H8	G G S I N S - - F Y W S
H11	G G S I S S G G Y Y W S
共有:	G G S X <sub>21</sub> X <sub>22</sub> X <sub>23</sub> X <sub>24</sub> X <sub>25</sub> X <sub>26</sub> Y W S (按出现的顺序分别为SEQ IDNO 126, 94, 126, 174和252)
<p>X<sub>21</sub>是异亮氨酸残基或苯丙氨酸残基                  X<sub>22</sub>是天冬酰胺残基或丝氨酸残基                  X<sub>23</sub>是丝氨酸残基或丙氨酸残基                  X<sub>24</sub>是甘氨酸残基或无残基                  X<sub>25</sub>是甘氨酸残基或无残基                  X<sub>26</sub>是苯丙氨酸残基或酪氨酸残基</p>	

[0320]

H7	G F T F I S Y G M H
H4	G Y T F T G Y Y I H
H2, H9	G F T F S S Y G M H
H10	G Y S F T S Y W I G
共有:	G X <sub>27</sub> X <sub>28</sub> F X <sub>29</sub> X <sub>30</sub> Y X <sub>31</sub> X <sub>32</sub> X <sub>33</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 110, 256, 285, 158和257)
<p>X<sub>27</sub>是酪氨酸残基或苯丙氨酸残基,                  X<sub>28</sub>是苏氨酸残基或丝氨酸残基,                  X<sub>29</sub>是苏氨酸残基、丝氨酸残基或异亮氨酸残基,                  X<sub>30</sub>是甘氨酸残基或丝氨酸残基,                  X<sub>31</sub>是酪氨酸残基、甘氨酸残基或色氨酸残基,                  X<sub>32</sub>是异亮氨酸残基或甲硫氨酸残基,                  X<sub>33</sub>是组氨酸残基或甘氨酸残基</p>	
H13	G Y T F T S Y G L S
H12	G F T F S A Y G M H
H3	G F T F S S Y W M S
H1, H14	G Y T F T S Y G I S
共有:	G X <sub>34</sub> T F X <sub>35</sub> X <sub>36</sub> Y X <sub>37</sub> X <sub>38</sub> X <sub>39</sub> (按出现的顺序分别为SEQ IDNO 62, 190, 286, 206和140)
<p>X<sub>34</sub>是酪氨酸残基或苯丙氨酸残基,                  X<sub>35</sub>是苏氨酸残基或丝氨酸残基,                  X<sub>36</sub>是丝氨酸残基或丙氨酸残基,                  X<sub>37</sub>是甘氨酸残基或色氨酸残基,                  X<sub>38</sub>是亮氨酸残基、甲硫氨酸残基或异亮氨酸残基,                  X<sub>39</sub>是丝氨酸残基或组氨酸残基</p>	

[0321] 表 5 :抗体 A1-A14 的重链 CDR2 共有序列

[0322]

重链	CDR2序列
H11	Y I S Y S G S T Y Y N P S L K S
H5	Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S
H6	E I N H S G G T N Y N P S L K S
H8	Y I Y Y S G S T N Y N P S L K R
共有:	X <sub>47</sub> I X <sub>48</sub> X <sub>49</sub> S G X <sub>50</sub> T X <sub>51</sub> Y N P S L K X <sub>52</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 175, 79, 95, 127和142)
	X <sub>47</sub> 是酪氨酸残基或谷氨酸残基, X <sub>48</sub> 是丝氨酸残基、酪氨酸残基或天冬酰胺残基, X <sub>49</sub> 是酪氨酸残基或组氨酸残基 X <sub>50</sub> 是丝氨酸残基或甘氨酸残基 X <sub>51</sub> 是酪氨酸残基或天冬酰胺残基, X <sub>52</sub> 是丝氨酸残基或精氨酸残基
H2, H9	V I W Y D G S N K Y H A D S V K G
H12	V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G
H3	N I K Q D G S E E Y Y V D S V K G
H7	V I W Y D G S T E Y Y A D S V K G
共有:	X <sub>53</sub> I X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> D G S X <sub>56</sub> X <sub>57</sub> Y X <sub>58</sub> X <sub>59</sub> D S V K G (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 143, 191, 287, 111和179)
	X <sub>53</sub> 是天冬酰胺残基或缬氨酸残基, X <sub>54</sub> 是色氨酸残基或赖氨酸残基, X <sub>55</sub> 是酪氨酸残基或谷氨酰胺残基, X <sub>56</sub> 是天冬酰胺残基、谷氨酸残基或丝氨酸残基, X <sub>57</sub> 是赖氨酸残基或谷氨酸残基, X <sub>58</sub> 是组氨酸残基或酪氨酸残基, X <sub>59</sub> 是丙氨酸残基或缬氨酸残基
H4	W I N P N S G G T N Y A Q K F Q G
H1	W I I P Y N G N T N S A Q K L Q G

[0323]

H13	W I S A Y N G N T N Y A Q K F Q G
H14	W I S P Y N G N T N Y A Q K F Q G
H10	I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G
共有:	X <sub>60</sub> I X <sub>61</sub> X <sub>62</sub> X <sub>63</sub> X <sub>64</sub> X <sub>65</sub> X <sub>66</sub> T X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> Q G (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 258, 63, 207, 259, 159 和180)

X<sub>60</sub>是色氨酸残基或异亮氨酸残基,  
 X<sub>61</sub>是天冬酰胺残基、异亮氨酸残基、丝氨酸残基或酪氨酸残基,  
 X<sub>62</sub>是脯氨酸残基或丙氨酸残基,  
 X<sub>63</sub>是天冬酰胺残基、酪氨酸残基或甘氨酸残基,  
 X<sub>64</sub>是丝氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,  
 X<sub>65</sub>是甘氨酸残基或丝氨酸残基,  
 X<sub>66</sub>是甘氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,  
 X<sub>67</sub>是天冬酰胺残基或精氨酸残基,  
 X<sub>68</sub>是酪氨酸残基或丝氨酸残基,  
 X<sub>69</sub>是丙氨酸残基或丝氨酸残基,  
 X<sub>70</sub>是谷氨酰胺残基或脯氨酸残基,  
 X<sub>71</sub>是赖氨酸残基或丝氨酸残基,  
 X<sub>72</sub>是苯丙氨酸残基或亮氨酸残基,

[0324] 表 6 :抗体 A1-A14 的重链 CDR3 共有序列

[0325]

重链	CDR3序列
H5, H8	- - D S I A A P F D Y
H6	V Q W L E L A Y F D Y
H10	- - - - Q G L G F D Y
共有:	X <sub>87</sub> X <sub>88</sub> X <sub>89</sub> X <sub>90</sub> X <sub>91</sub> X <sub>92</sub> X <sub>93</sub> X <sub>94</sub> F D Y (按出现的序列分别为SEQ ID NO 80, 96, 160 和187)

X<sub>87</sub>是缬氨酸残基或无残基,

[0326]

<p>X<sub>88</sub>是谷氨酰胺残基或无残基，                  X<sub>89</sub>是天冬氨酸残基、色氨酸残基或无残基，                  X<sub>90</sub>是丝氨酸残基、亮氨酸残基或无残基，                  X<sub>91</sub>是异亮氨酸残基、谷氨酸残基或谷氨酰胺残基，                  X<sub>92</sub>是丙氨酸残基、亮氨酸残基或甘氨酸残基，                  X<sub>93</sub>是丙氨酸残基或亮氨酸残基，                  X<sub>94</sub>是脯氨酸残基、酪氨酸残基或甘氨酸残基</p>	
H13	D Q D Y Y D S S G W - G H
H14	D Q D Y Y D S S G W - D P
H11	- - A Y G D Y R G W F D P
共有：	X <sub>95</sub> X <sub>96</sub> X <sub>97</sub> Y X <sub>98</sub> D X <sub>99</sub> X <sub>100</sub> G W X <sub>101</sub> X <sub>102</sub> X <sub>103</sub> (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 208, 224, 176 和188)
<p>X<sub>95</sub>是天冬氨酸残基或无残基                  X<sub>96</sub>是谷氨酰胺残基或无残基，                  X<sub>97</sub>是天冬氨酸残基或丙氨酸残基，                  X<sub>98</sub>是酪氨酸残基或甘氨酸残基，                  X<sub>99</sub>是丝氨酸残基或酪氨酸残基，                  X<sub>100</sub>是丝氨酸残基或精氨酸残基，                  X<sub>101</sub>是苯丙氨酸残基或无残基，                  X<sub>102</sub>是甘氨酸残基或天冬氨酸残基，                  X<sub>103</sub>是组氨酸残基或脯氨酸残基，</p>	
H4	- - - D S G Y S S S W H F D Y -
H1	- - - D R D Y G V N Y D A F D I
H2	- S R N W N Y D N Y Y Y G L D V
H12	- S R N W N Y D S Y Q Y G L D V
H9	- S R N W N Y D N Y Y Y G L D V
H3	G S S S W Y Y - Y N G M D V -
H7	- E R Q W L Y - - H Y G M D V

[0327]



共有：	$X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}X_{109}Y$ $X_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$ (按出现的顺序分别为SEQ ID NO 260, 64, 144, 192, 144, 261, 112和249)
<p><math>X_{104}</math>是甘氨酸残基或无残基</p> <p><math>X_{105}</math>是丝氨酸残基、谷氨酸残基或无残基</p> <p><math>X_{106}</math>是精氨酸残基、丝氨酸残基或无残基，</p> <p><math>X_{107}</math>是天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、丝氨酸残基或谷氨酰胺残基</p> <p><math>X_{108}</math>是丝氨酸残基、精氨酸残基或色氨酸残基，</p> <p><math>X_{109}</math>是甘氨酸残基、天冬氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或亮氨酸残基，</p> <p><math>X_{110}</math>是丝氨酸残基、甘氨酸残基、天冬氨酸残基或无残基，</p> <p><math>X_{111}</math>是丝氨酸残基、缬氨酸残基、天冬酰胺残基或酪氨酸残基，</p> <p><math>X_{112}</math>是丝氨酸残基、天冬酰胺残基、酪氨酸残基或组氨酸残基</p> <p><math>X_{113}</math>是色氨酸残基、酪氨酸残基或谷氨酰胺残基，</p> <p><math>X_{114}</math>是组氨酸残基、天冬氨酸残基、酪氨酸残基或无残基，</p> <p><math>X_{115}</math>是苯丙氨酸残基、丙氨酸残基或甘氨酸残基，</p> <p><math>X_{116}</math>是天冬氨酸残基、苯丙氨酸残基、亮氨酸残基或甲硫氨酸残基，</p> <p><math>X_{117}</math>是酪氨酸残基或天冬氨酸残基，</p> <p><math>X_{118}</math>是异亮氨酸残基、缬氨酸残基或无残基</p>	

[0328] 在一个实施方案中，本发明提供了包含轻链可变结构域的抗原结合蛋白，所述轻链可变结构域包含与选自 L1 至 L14 的轻链可变结构域的序列只有 15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个残基不同的氨基酸序列，其中每个这样的序列差异独立地是一个氨基酸残基的删除、插入或置换。在另一个实施方案中，轻链可变结构域包含与选自 L1-L14 的轻链可变结构域的序列至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中，轻链可变结构域包含由与编码选自 L1-L14 (其包括 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13 和 L14) 的轻链可变结构域的核苷酸序列至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 相同的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在另一个实施方案中，轻链可变结构域包含通过在中等严格条件下与编码选自 L1-L14 的轻链可变结构域序列的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列。在另一个实施方案中，轻链可变结构域包含通过在中等严格条件下与编码选自 L1-L14 的轻链可变结构域序列的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸序列编码的氨基酸序列。在另一个实施

方案中,轻链可变结构域包含通过在中等严格条件下与 L1-L14 的轻链多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的氨基酸序列。

[0329] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含重链可变结构域的抗原结合蛋白,所述重链可变结构域包含与选自 H1 至 H14 的重链可变结构域只有 15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个残基不同的氨基酸序列,其中每个这样的序列差异独立地是一个氨基酸残基的删除、插入或置换。在另一个实施方案中,重链可变结构域包含与选自 H1-H14 的重链可变结构域的序列至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中,重链可变结构域包含由与编码选自 H1-H14 的重链可变结构域的核苷酸序列至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 相同的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在另一个实施方案中,重链可变结构域包含通过在中等严格条件下与编码选自 H1-H14 的重链可变结构域序列的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的氨基酸序列。在另一个实施方案中,重链可变结构域包含通过在中等严格条件下与编码选自 H1-H14 的重链可变结构域序列的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的氨基酸序列。在另一个实施方案中,重链可变结构域包含通过在中等严格条件下与本文中公开的重链多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的氨基酸序列。

[0330] 本发明的抗原结合蛋白的特定实施方案包括与本文中提及的一个或多个 CDR 和 / 或 FR 的氨基酸序列相同的一个或多个氨基酸序列。在一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 CDR1 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 CDR2 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 CDR3 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 CDR1 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 CDR2 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 CDR3 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 FR1 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 FR2 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 FR3 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的轻链 FR4 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 FR1 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 FR2 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 FR3 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含以上所示的重链 FR4 序列。

[0331] 在一个实施方案中,本发明提供了包含与以上所示的 CDR 序列相差不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸残基的一个或多个 CDR 序列的抗原结合蛋白。

[0332] 在另一个实施方案中,抗原结合蛋白 CDR3 序列中的至少一个是来自如表 7 或表 8 中所示的 A1-A14 的 CDR3 序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白的轻链 CDR3 序列是来自如表 7 中所示的 A1-A14 的轻链 CDR3 序列,和抗原结合蛋白的重链 CDR3 序列是来自如表 8 中所示的 A1-A14 的重链序列。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白包含 1、2、3、4 或 5 个 CDR 序列,其与 A1-A14 的 CDR 序列各自独立地相差 6、5、4、3、2、1 或 0 个单氨基酸添加、置换和 / 或删除,并且抗原结合蛋白进一步包含 1、2、3、4 或 5 个与 CDR 序列各自独立地相差 6、5、4、3、2、1 或 0 个单氨基酸添加、置换和 / 或删除的 CDR 序列。

[0333] 以下表 7 中显示了抗体 A1-A14 的轻链 CDR,而以下表 8 中显示了抗体 A1-A14 的重链 CDR。

[0334] 表 7 :轻链 CDR

[0335]

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
A1	SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO: 59)	QDSKRPS (SEQ ID NO: 60)	QAWDSSTAV (SEQ ID NO: 61)
A2	RASQGIRNNLG (SEQ ID NO: 281)	AASSLQS (SEQ ID NO: 283)	LQHNSYPWT (SEQ ID NO: 141)
A3	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 282)	AASSLQS (SEQ ID NO: 283)	RQQNTYPLT (SEQ ID NO: 284)
A4	RSSQSLLHSTGYNY LD (SEQ ID NO: 253)	LGSFRAS (SEQ ID NO: 254)	MQALQTPCS (SEQ ID NO: 255)
A5	KSSQSILYSSNNKKY LV (SEQ ID NO: 75)	WTSMRES (SEQ ID NO: 76)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO: 77)
A6	RASQISISNYLN (SEQ ID NO: 91)	ATSSLQS (SEQ ID NO: 92)	QQSYSISPT (SEQ ID NO: 93)
A7	RAGQGIRNDLV (SEQ ID NO: 107)	AASSLQS (SEQ ID NO: 283)	LQHNTYPFT (SEQ ID NO: 109)
A8	KSSQSILYSSNNKKY LV (SEQ ID NO: 75)	WTSMRES (SEQ ID NO: 76)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO: 77)
A9	RASQGIRNNLG (SEQ ID NO: 281)	AASSLQS (SEQ ID NO: 283)	LQHNSYPWT (SEQ ID NO: 141)
A10	SGEKWGEKYAC (SEQ ID NO: 155)	QDTKRPS (SEQ ID NO: 156)	QAWDRSTV (SEQ ID NO: 157)
A11	SGDKLGDKFAF (SEQ ID NO: 171)	QDNKRPS (SEQ ID NO: 172)	QAWDSSTVV (SEQ ID NO: 173)
A12	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 282)	AASSLQS (SEQ ID NO: 283)	LQHNSYTWT (SEQ ID NO: 189)
A13	SGDKLGDKYVC (SEQ ID NO: 203)	LDNKRPS (SEQ ID NO: 204)	QAWDSSTV (SEQ ID NO: 205)
A14	SGDKLGDKYAF	HDTKRPS (SEQ	QAWDSSTV (SEQ

[0336]

	(SEQ ID NO: 219)	ID NO: 220)	ID NO: 205)
--	------------------	-------------	-------------

[0337] 表 8 :重链 CDR

[0338]

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
A1	GYTFTSYGLS (SEQ ID NO: 62)	WIIPYNGNTNSAQK LQG (SEQ ID NO: 63)	DRDYGVNYDAFD I (SEQ ID NO: 64)
A2	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 285)	VIWYDGSNKYHADS VKG (SEQ ID NO: 143)	SRNWNVDNYYY GLDV (SEQ ID NO: 144)
A3	GFTFSSYWMS (SEQ ID NO: 286)	NIKQDGSEEYYVDS VKG (SEQ ID NO: 287)	GSSSWYYNYGM DV (SEQ ID NO: 288)
A4	GYTFTGYIHH (SEQ ID NO: 256)	WINPNSGGTNYAQK FQG (SEQ ID NO: 258)	DSGYSSSWHFDY (SEQ ID NO: 260)
A5	GGINSIFYWS (SEQ ID NO: 78)	YIYYSGSTNYNPSLK S (SEQ ID NO: 79)	DSIAAPFDY (SEQ ID NO: 80)
A6	GGSFSAYYWS (SEQ ID NO: 94)	EINHSGGTNYNPSLK S (SEQ ID NO: 95)	VQWLELAYFDY (SEQ ID NO: 96)
A7	GFTFISYGMH (SEQ ID NO: 110)	VIWYDGSSTEYYADS VKG (SEQ ID NO: 111)	ERQWLYHYGMD V (SEQ ID NO: 112)
A8	GGINSIFYWS (SEQ ID NO: 126)	YIYYSGSTNYNPSLK R (SEQ ID NO: 127)	DSIAAPFDY (SEQ ID NO: 80)
A9	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 285)	VIWYDGSNKYHADS VKG (SEQ ID NO: 143)	SRNWNVDNYYY GLDV (SEQ ID NO: 144)
A10	GYSFTSYWIG (SEQ ID NO: 158)	IYPGDS DTRYSPSFQ G (SEQ ID NO: 159)	QGLGFDY (SEQ ID NO: 160)

[0339]

A11	GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 174)	YISYSGSTYYNPSLK S (SEQ ID NO: 175)	AYGDYRGWFDP (SEQ ID NO: 176)
A12	GFTFSAYGMH (SEQ ID NO: 190)	VIWYDGSNKYYADS VKG (SEQ ID NO: 191)	SRNWNYSYQYG LDV (SEQ ID NO: 192)
A13	GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 206)	WISAYNGNTNYAQK FQG (SEQ ID NO: 207)	DQDYDSSGWGH (SEQ ID NO: 208)
A14	GYTFTSYGIS (SEQ ID NO: 206)	WISPYNGNTNYAQK FQG (SEQ ID NO: 259)	DQDYDSSGWDP (SEQ ID NO: 224)

[0340] 例如,可以通过随机诱变或通过定点诱变(例如,寡核苷酸-定点特异性诱变)来改变A1-A14的核苷酸序列或A1-A14的氨基酸序列,以形成与未突变的多核苷酸相比包括一个或多个特定核苷酸置换、删除或插入的变化的多核苷酸。用于形成这样的变化的技术的实例描述于Walder等,1986, Gene 42:133; Bauer等, 1985, Gene 37:73; Craik, BioTechniques, January 1985, 12-19; Smith等, 1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; 和美国专利 Nos. 4, 518, 584 和 4, 737, 462 中。这些和其他方法可以用于制备例如具有所需特性的抗激活素 A 抗体的衍生物,例如与未衍生的抗体相比,提高的对激活素 A 的亲合性、亲合力或特异性,提高的体内或体外活性或稳定性,或降低的体内副作用。

[0341] 本发明范围内的抗激活素 A 抗体的其他衍生物包括抗激活素 A 抗体或其片段与其他蛋白质或多肽的共价或聚集缀合物,如通过包含与抗激活素 A 抗体多肽的 N-端或 C-端融合的异源多肽的重组融合蛋白的表达。例如,缀合的肽可以是异源信号(或前导)多肽,例如,酵母  $\alpha$ -因子前导序列,或如表位标签的肽。含抗原结合蛋白的融合蛋白可以包含添加来促进抗原结合蛋白的纯化或鉴别的肽(例如,多-His)。抗原结合蛋白还可以连接到 FLAG 肽 Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 226), 如 Hopp 等, Bio/Technology 6:1204, 1988 和美国专利 5, 011, 912 中所述的。FLAG 肽是高度抗原性的并且提供特定单克隆抗体 (mAb) 可逆结合的表位,使得能够快速分析以及简易纯化表达的重组蛋白。可用于制备其中 FLAG 肽与给定的多肽融合的融合蛋白的试剂是商业上可购得的 (Sigma, St. Louis, MO)。

[0342] 本文中使用的术语“Fc 多肽”包括源自抗体的 Fc 区的多肽的天然或突变蛋白形式。还包括含有促进二聚化的铰链区的此类多肽的截短形式。包含 Fc 部分(和由其形成的寡聚物)的融合蛋白提供了优于蛋白 A 或蛋白 G 柱的亲合色谱的简易纯化的优势。

[0343] 一种合适的 Fc 多肽,描述于 PCT 申请 W093/10151 中(按引用并入本文中),是从

人 IgG1 抗体的 Fc 区的 N- 端铰链区延伸至天然 C- 端的单链多肽。另一种有用的 Fc 多肽是美国专利 5, 457, 035 和 Baum 等, 1994, EMBO J. 13:3992-4001 中描述的 Fc 突变蛋白。这种突变蛋白的氨基酸序列与 W093/10151 中呈现的天然 Fc 序列相同, 除了氨基酸 19 已经从 Leu 变成 Ala, 氨基酸 20 已经从 Leu 变成 Glu, 和氨基酸 22 已经从 Gly 变成 Ala。该突变蛋白呈现出对 Fc 受体的降低的亲合性。

[0344] 在其他实施方案中, 抗激活素 A 抗体的重链和 / 或轻链的可变部分可以替代抗体重链和 / 或轻链的可变部分。

[0345] 含有一个或多个抗原结合蛋白的寡聚物可以用作抗激活素 A 拮抗剂。寡聚物可以是共价连接或非共价连接的二聚物、三聚物或更高阶寡聚物的形式。考虑使用包括两个或更多个抗原结合蛋白的寡聚物, 一个实例是同型二聚物。其他寡聚物包括杂二聚物、同型三聚物、杂三聚物、同型四聚物、杂四聚物等。

[0346] 一个实施方案涉及包含通过与抗原结合蛋白融合的肽部分之间的共价或非共价相互作用连接的多个抗原结合蛋白的寡聚物。这样的肽可以是肽接头 (间隔物), 或具有促进寡聚化的特性的肽。亮氨酸拉链和源自抗体的某些多肽是可以促进与其连接的抗原结合蛋白寡聚化的肽, 如以下更详细地描述的。

[0347] 在特别的实施方案中, 寡聚物包含两个至四个抗原结合蛋白。寡聚物的抗原结合蛋白可以是任何形式的, 如以上所述形式的任一种, 例如, 变体或片段。优选地, 寡聚物包含具有激活素 A 结合活性的抗原结合蛋白。

[0348] 在一个实施方案中, 使用源自免疫球蛋白的多肽制备寡聚物。已经例如由 Ashkenazi 等, 1991, PNAS USA 88:10535 ;Byrn 等, 1990, Nature344:677 ; 和 Hollenbaugh 等, 1992Curr. Prot. s in Immunol. , Suppl. 4, 第 10. 19. 1-10. 19. 11 页描述了包含与抗体衍生的多肽的各个部分 (包括 Fc 结构域) 融合的特定异源多肽的融合蛋白的制备。

[0349] 本发明的一个实施方案涉及包含通过将抗激活素 A 抗体的激活素 A 结合片段与抗体的 Fc 区融合形成的两个融合蛋白的二聚物。例如, 可以通过将编码融合蛋白的基因融合插入合适的表达载体, 在用重组表达载体转化的宿主细胞中表达基因融合, 并使得表达的融合蛋白更像抗体分子装配来制备二聚物, 由此 Fc 部分之间形成链间二硫键以产生二聚物。

[0350] 或者, 寡聚物是包括多个抗原结合蛋白的融合蛋白, 使用或未用肽接头 (间隔物肽)。合适的肽接头是美国专利 4, 751, 180 和 4, 935, 233 中描述的那些。

[0351] 制备寡聚抗原结合蛋白的另一种方法涉及使用亮氨酸拉链。亮氨酸拉链结构域是促进它们存在于其中的蛋白质的寡聚化的肽。亮氨酸拉链最初在几种 DNA 结合蛋白中鉴别 (Landschulz 等, 1988, Science 240:1759), 并且从那时开始已经在多种不同蛋白质中发现。已知的亮氨酸拉链包括天然产生的肽及二聚化或三聚化的其衍生物。适用于产生合适的寡聚蛋白质的亮氨酸拉链结构域的实例描述于 PCT 申请 W094/10308 中, 并且源自肺表面活性剂蛋白 D (SPD) 的亮氨酸拉链描述于 Hoppe 等, 1994, FEBS Letters 344:191 中, 其按引用并入本文中。使用允许与其融合的异源蛋白的稳定三聚化的修饰亮氨酸拉链的使用描述于 Fanslow 等, 1994, Semin. Immunol. 6:267-78 中。在一种途径中, 在合适的宿主细胞中表达包含与亮氨酸拉链肽融合的抗激活素 A 抗体片段或衍生物的重组融合蛋白, 并且从培养物上清液回收形成的可溶性寡聚抗激活素 A 抗体片段或衍生物。

[0352] 在一个方面中,本发明提供了干扰激活素 A 与激活素 A 受体结合的抗原结合蛋白。这样的抗原结合蛋白可以针对激活素 A 或其片段、变体或衍生物来制备,并在常规试验中针对干扰激活素 A 与激活素 A 受体结合的能力来筛选。合适试验的实例是测试抗原结合蛋白抑制激活素 A 与表达激活素 A 受体的细胞结合的能力的试验,或测试抗原结合蛋白降低从激活素 A 与细胞表面激活素 A 受体结合获得的生物或细胞反应的能力的测试。例如,可以根据其结合固定化抗体表面(激活素 A 和 / 或激活素 B) 的能力来筛选抗体。阻断激活素 A 与激活素 A 受体结合的抗原结合蛋白可以用于治疗任何激活素 A 相关的病症,包括但不限于恶病质。在一个实施方案中,将通过涉及转基因小鼠的免疫的程序产生的人抗激活素 A 单克隆抗体用于治疗这样的病症。

[0353] 可以通过常规技术产生本发明的抗原结合蛋白的抗原结合片段。这样的片段的实例包括,但不限于,Fab 和 (Fab')<sub>2</sub> 片段。还考虑了通过遗传工程技术产生的抗体片段和衍生物。

[0354] 其他实施方案包括嵌合抗体,例如,非人(例如,鼠)单克隆抗体的人源化形式。这样的人源化抗体可以通过已知技术来制备,并在抗体施用于人时提供降低的致免疫原性的优势。在一个实施方案中,人源化单克隆抗体包含鼠抗体的可变结构域(或其抗原结合位点的全部或部分)和源自人抗体的恒定结构域。或者,人源化抗体片段可以包含鼠单克隆抗体的抗原结合位点和源自人抗体的可变结构域片段(缺乏抗原结合位点)。用于产生嵌合的并且进一步工程化的单克隆抗体的程序包括 Riechmann 等,1988, Nature 332:323, Liu 等,1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439, Larrick 等,1989, Bio/Technology 7:934 和 Winter 等 1993, TIPS 14:139 中所述的那些。在一个实施方案中,嵌合抗体是 CDR 嫁接抗体。用于人源化抗体的技术在例如,美国专利 No. 5, 869, 619、5, 225, 539、5, 821, 337、5, 859, 205、6, 881, 557, Padlan 等,1995, FASEB J. 9:133-39 和 Tamura 等,2000, J. Immunol. 164:1432-41 中有讨论。

[0355] 已经发展了针对在非人动物中产生人或部分人抗体的程序。例如,已经制得了其中一个或多个内源性免疫球蛋白基因通过各种方式灭活的小鼠。已经将人免疫球蛋白基因引入小鼠中以替代灭活的小鼠基因。动物中产生的抗体整合了由引入动物中的人遗传物质编码的人免疫球蛋白多肽链。在一个实施方案中,用激活素 A 多肽免疫非人动物,如转基因小鼠,使得在动物中产生针对激活素 A 多肽的抗体。

[0356] 合适的免疫原的一个实例是可溶性人激活素 A,如包含具有以下序列的蛋白质的胞外结构域的多肽:Gly Leu Glu Cys Asp Gly Lys Val Asn Ile Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Pro Ser His Ile Ala Gly Thr Ser Gly Ser Ser Leu Ser Phe His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser (SEQ ID NO:225),或蛋白质的其他免疫原性片段。用于产生和使用转基因动物用于产生人或部分人抗体的技术的实例描述于美国专利 5, 814, 318、5, 569, 825 和 5, 545, 806, Davis 等,2003, Production of human antibodies from transgenic mice(从转基因小鼠生产人抗体),在 Lo 编辑的 Antibody Engineering:Methods and

Protocols(抗体工程化:方法和实验方案)中, Humana Press, NJ:191-200, Kellermann 等, 2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97, Russel 等, 2000, *Infect Immun.* 68:1820-26, Gallo 等, 2000, *Eur J Immun.* 30:534-40, Davis 等, 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25, Green, 1999, *J Immunol Methods.* 231:11-23, Jakobovits, 1998, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:33-42, Green 等, 1998, *J Exp Med.* 188:483-95, Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7:607-14, Tsuda 等, 1997, *Genomics.* 42:413-21, Mendez 等, 1997, *Nat Genet.* 15:146-56, Jakobovits, 1994, *Curr Biol.* 4:761-63, Arbones 等, 1994, *Immunity.* 1:247-60, Green 等, 1994, *Nat Genet.* 7:13-21, Jakobovits 等, 1993, *Nature.* 362:255-58, Jakobovits 等, 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2551-55. Chen, J., M. Trounstine, F. W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar. *Inter' l Immunol.* 5(1993):647-656, Choi 等, 1993, *Nature Genetics* 4:117-23, Fishwild 等, 1996, *Nature Biotech.* 14:845-51, Harding 等, 1995, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Lonberg 等, 1994, *Nature* 368:856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology(实验药理学手册中的人单克隆抗体的转基因方法)*, 113:49-101, Lonberg 等, 1995, *Internal Review of Immunology* 13:65-93, Neuberger, 1996, *Nature Biotechnology* 14:826, Taylor 等, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:6287-95, Taylor 等, 1994, *Inter' l Immunol.* 6:579-91, Tomizuka 等, 1997, *Nature Genetics* 16:133-43, Tomizuka 等, 2000, *Pro. Nat' l Acad. Sci. USA* 97:722-27, Tuailon 等, 1993, *Pro. Nat' l Acad. Sci. USA* 90:3720-24 和 Tuailon 等, 1994, *J. Immunol.* 152:2912-20 中。

[0357] 在另一个方面中,本发明提供了结合激活素 A 的单克隆抗体。可以使用多种已知技术来产生本发明的单克隆抗体。通常,可以通过本领域技术人员已知的方法(参见,例如, Kohler 等, *Nature* 256:495, 1975; Coligan 等(编辑), *Current Protocols in Immunology*, 1:2. 5. 12. 6. 7(John Wiley&Sons 1991); 美国专利 No. RE 32, 011、4, 902, 614、4, 543, 439 和 4, 411, 993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn 和 Bechtol(编辑)(1980); 和 *Antibodies: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)*, Harlow 和 Lane(编辑), Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988); Picksley 等, "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*(相对大肠杆菌中表达的蛋白质的单克隆抗体的生产)", 在 *DNA Cloning 2: Expression Systems(DNA 克隆 2: 表达系统)*, 第 2 版中, Glover 等(编辑), 第 93 页(牛津大学出版社 1995)) 获得结合特定抗原的单克隆抗体。可以使用任何合适的标准技术,如蛋白水解消化,或任选地,通过蛋白水解消化(例如,使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶)接着二硫键的温和还原和烷基化,从其衍生抗体片段。或者,还可以通过如本文中所述的重组遗传工程技术来产生这样的片段。

[0358] 可以根据本领域已知的和本文中所述的方法,通过对动物(例如,大鼠、仓鼠、兔或优选小鼠,包括例如转基因的或敲除的,如本领域已知的)注射包括人激活素 A(caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctteggagac cctgtccctc acctgcactg tctctggtgg ctccatcaat agtttctact ggagctggat ccggcagecc ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaat cctcctccta agagtcgagt



caccatata gtagacacgt ccaagacceca gttctccctg aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg  
gccgtgtatt actgtgagag agacagtata gcagccccct ttgactactg gggccaggga accctgtgta  
ccgtctctc agcttcacc aagggeccat ccgtcttccc cctggcgccc tgcctccagga gcacctccga  
gagcacagecgcctgggt gectgtgcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca

tgcgcct (SEQ ID NO:66) 或其片段的免疫原来获得单克隆抗体。可以使用本领域已知的和本文中描述的几种免疫检测方法中的任何一种,通过获得血清样品和检测结合人激活素 A 或肽的抗体的存在,在初始注射后和 / 或加强注射后监测特定抗体产生的存在。从产生所需抗体的动物取出淋巴细胞,最常见来自脾或淋巴结的细胞,来获得 B- 淋巴细胞。然后将 B- 淋巴细胞与药物敏化的骨髓瘤细胞融合伴体融合,优选与免疫的动物同源并且任选具有其他所需特性 (例如,不能表达内源性 Ig 基因产物,例如, P3X63-Ag 8.653 (ATCC No. CRL 1580) ;NS0, SP20) 的伴体,以产生杂交瘤,其是永生化真核细胞系。

[0359] 淋巴 (例如,脾) 细胞和黑素瘤细胞可以使用膜融合促进剂 (如,聚乙二醇或非离子型去污剂) 混合几分钟,然后以低密度涂布于支持杂交瘤细胞生长但不支持未融合的黑素瘤细胞生长的选择培养基上。优选的选择培养基是 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶)。足够的时间后,通常约一至两周,观察到细胞的集落。使用本领域已知的和本文中描述的多种免疫分析中的任何一种分离单个集落,并且可以测试由细胞产生的抗体与人激活素 A 的结合活性。克隆杂交瘤 (例如,通过有限稀释克隆或通过软琼脂斑块分离),并且选择和培养产生对激活素 A 特异性的抗体的阳性克隆。可以从杂交瘤培养物的上清液分离来自杂交瘤培养物的单克隆抗体。

[0360] 用于鼠单克隆抗体产生的替代方法是将杂交瘤细胞注入同系小鼠的腹腔中,所述同系小鼠例如为已经过处理 (例如,姥蛟烷 - 激发的) 以促进含有单克隆抗体的腹水形成的小鼠。可以通过多种已确立的技术来分离和纯化单克隆抗体。这样的分离技术包括使用蛋白 A 琼脂糖的亲和色谱、大小排阻色谱和离子交换色谱 (参见,例如, Coligan, 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页 ;Baines 等,“Purification of Immunoglobulin G (IgG) (免疫球蛋白 G (IgG) 的纯化”,在 *Methods in Molecular Biology* 中, Vol. 10, 第 79-104 页 (The Humana Press, Inc. 1992))。可以使用基于抗体的特定特性 (例如,重链或轻链同种型,结合特异性等) 选择的合适配体,通过亲和色谱来纯化单克隆抗体。固定于固体支持物上的合适配体的实例包括蛋白 A、蛋白 G、抗恒定区 (轻链或重链) 抗体、抗独特型抗体和 TGF- $\beta$  结合蛋白,或其片段或变体。

[0361] 可以使用本领域已知的任何技术来产生单克隆抗体,例如,通过使完成免疫计划后从转基因动物收集的脾细胞永生化。可以使用本领域已知的任何技术使脾细胞永生化,例如,通过将其与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤。鉴别产生结合激活素 A 多肽的抗体的杂交瘤细胞。本发明包括这样的杂交瘤细胞系,以及由其产生的抗激活素 A 单克隆抗体。用于杂交瘤产生融合程序的骨髓瘤细胞优选是不产生抗体的,具有高融合效率,并且是酶缺陷的,使其不能够在只支持所需融合细胞 (杂交瘤) 生长的特定选择性培养基中生长。用于小鼠融合的合适细胞系的实例包括 Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1. Ag 41、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0Bu1 ;用于大鼠融合中的细胞系的实例包括 R210、RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F 和 4B210。可用于细胞融合的其他细胞系是 U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6。可以进一步筛选杂交瘤或 mAb 以

鉴别具有特定特性的 mAb, 如阻断激活素 A 诱导的活性的能力。

[0362] 本发明的抗体还可以是全人单克隆抗体。提供了特异性地结合激活素 A 的半胱氨酸结区域 (氨基酸 C11-S33 和 / 或氨基酸 C81-E111) 的分离的全人抗体, 其中抗原结合蛋白具有人抗激活素 A 抗体的至少一种体内生物活性。生物活性可以是恶病质的减弱, 例如, 结肠癌中的恶病质, 如在本文中所述的结肠癌的小鼠模型中。适合这种治疗的恶病质与体重减轻、肌肉质量降低和 / 或脂肪质量降低相关。恶病质可以与类风湿性关节炎相关, 如胶原蛋白诱导的类风湿性关节炎的动物模型中。用本文中所述的全人抗体的治疗改善了胶原蛋白诱导的类风湿性关节炎动物模型中的体内体重减轻、肌肉质量降低和 / 或脂肪质量降低。本文中所述的全人抗体在 AAV- 激活素 A 转染的动物模型中改善了体重减轻。本文中所述的特异性地结合激活素 A 的半胱氨酸结区域 (氨基酸 C11-S33 和 / 或氨基酸 C81-E111) 的全人抗体在体外抑制激活素 A 与激活素 A 受体的结合。特异性地结合激活素 A 的半胱氨酸结区域 (氨基酸 C11-S33 和 / 或氨基酸 C81-E111) 的全人分离抗体在体内抑制激活素 A 与激活素 A 受体的结合。

[0363] 可以通过本领域普通技术人员熟知的多种技术来产生全人单克隆抗体。这样的方法包括, 但不限于, 人外周血细胞 (例如, 含 B 淋巴细胞) 的 Epstein Barr 病毒 (EBV) 转化、人 B- 细胞的体外免疫、来自携带插入的人免疫球蛋白基因的免疫的转基因小鼠的脾细胞的融合、从人免疫球蛋白 V 区噬菌体文库分离或本领域已知的和基于本文公开内容的其他程序。例如, 可以从已经工程化来响应于抗原激发而产生特异性人抗体的转基因小鼠获得全人单克隆抗体。例如, 由 Green 等, *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg 等, *Nature* 368:856, 1994; Taylor 等, *Int. Immun.* 6:579, 1994; 美国专利 No. 5, 877, 397; Bruggemann 等, 1997 *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58; Jakobovits 等, 1995 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:525-35 描述了从转基因小鼠获得全人抗体的方法。在这种技术中, 将人重链和轻链基因座的元件引入源自胚胎干细胞系的小鼠株系中, 所述胚胎干细胞系包含内源性重链和轻链基因座的靶向破坏 (也参见 Bruggemann 等, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58 (1997))。例如, 人免疫球蛋白转基因可以是小基因构建体, 或酵母人工染色体上的转座子, 其在小鼠淋巴组织中经历 B- 细胞特异性 DNA 重排和超突变。可以通过免疫转基因小鼠 (其然后可以产生激活素 A 特异性的人抗体) 获得全人单克隆抗体。根据本文中所述的方法, 免疫的转基因小鼠的淋巴细胞可以用于产生人抗体分泌杂交瘤。从免疫动物的血液还可以获得含有全人抗体的多克隆血清。

[0364] 用于产生本发明的人抗体的另一种方法包括通过 EBV 转化使人外周血细胞永生。参见, 例如, 美国专利 No. 4, 464, 456。可以通过本文中提供的免疫检测方法, 例如, ELISA, 来鉴别产生特异性结合激活素 A 的单克隆抗体的这种永生 B- 细胞系 (或成淋巴细胞样细胞系), 然后通过标准克隆技术分离。可以根据本领域已知的方法 (参见, 例如, Glasky 等, *Hybridoma* 8:377-89 (1989)), 通过将转化的细胞系与鼠骨髓瘤融合以产生小鼠-人杂交细胞系, 从而可以提高产生抗激活素 A 抗体的成淋巴细胞样细胞系的稳定性。再另一种产生人单克隆抗体的方法是体外免疫, 其包括用人激活素 A 激发人脾 B- 细胞, 接着将激发的 B- 细胞与异杂合 (heterohybrid) 融合伴体融合。参见, 例如, Boerner 等, 1991, *J. Immunol.* 147:86-95。

[0365] 在特定的实施方案中, 根据本领域已知的 (WO 92/02551; 美国专利 5, 627, 052;

Babcook 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48(1996)) 和本文中描述的分子生物学技术, 选择产生抗人激活素 A 抗体的 B- 细胞, 并且从 B- 细胞克隆轻链和重链可变区。可以通过选择产生特异性结合激活素 A 的抗体的细胞, 从脾、淋巴结或外周血样品分离来自免疫的动物的 B- 细胞。还可以从人, 例如, 从外周血样品, 分离 B- 细胞。用于检测产生具有所需特异性的抗体的单一 B- 细胞的方法是本领域公知的, 例如, 通过斑块形成、荧光激活细胞分选、体外刺激接着检测特异性抗体等。用于选择特异性抗体产生 B- 细胞的方法包括, 例如, 在含有人激活素 A 的软琼脂中制备 B- 细胞的单细胞悬浮液。由 B- 细胞产生的特异性抗体与抗原的结合导致复合物的形成, 其作为免疫沉淀物可能是可见的。选择产生所需抗体的 B- 细胞后, 可以根据本领域已知的和本文中描述的方法, 通过分离和扩增 DNA 或 mRNA 来克隆特异性抗体基因。

[0366] 用于获得本发明抗体的其他方法是通过噬菌体展示。参见, 例如, Winter 等, 1994Annu. Rev. Immunol. 12:433-55 ;Burton 等, 1994Adv. Immunol. 57:191-280。可以在噬菌体载体中形成人或鼠免疫球蛋白可变区基因组文库, 其可以以筛选来选择特异性结合 TGF- $\beta$  结合蛋白或其变体或片段的 Ig 片段 (Fab、Fv、sFv, 或其多聚体)。参见, 例如, 美国专利 No. 5, 223, 409 ;Huse 等, 1989Science 246:1275-81 ;Sastry 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32(1989) ;Alting-Mees 等, Strategies in Molecular Biology 3:1-9(1990) ;Kang 等, 1991Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66 ;Hoogenboom 等, 1992J. Molec. Biol. 227:381-388 ;Schlebusch 等, 1997Hybridoma 16:47-52, 以及其中引用的参考文献。例如, 含有多个编码 Ig 可变区片段的多核苷酸序列的文库可以插入丝状噬菌体 (如 M13 或其变体) 的基因组中, 与编码噬菌体外壳蛋白的序列同框。融合蛋白可以是外壳蛋白与轻链可变区结构域和 / 或与重链可变区结构域的融合。根据特定的实施方案, 免疫球蛋白 Fab 片段还可以在噬菌体颗粒上展示 (参见, 例如, 美国专利 No. 5, 698, 426)。

[0367] 还可以在  $\lambda$  噬菌体中制备重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库, 例如, 使用  $\lambda$  ImmunoZap<sup>TM</sup>(H) 和  $\lambda$  ImmunoZap<sup>TM</sup>(L) 载体 (Stratagene, La Jolla, California)。简而言之, 从 B- 细胞群体分离 mRNA, 并用于在  $\lambda$  ImmunoZap<sup>TM</sup>(H) 和  $\lambda$  ImmunoZap<sup>TM</sup>(L) 载体中形成重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库。这些载体可以单独地筛选或共表达来形成 Fab 片段或抗体 (参见 Huse 等, 上文 ;还可以参见 Sastry 等, 上文)。随后将阳性斑块转化成非溶解性质粒, 其允许从大肠杆菌高水平地表达单克隆抗体片段。

[0368] 在一个实施方案中, 在杂交瘤中, 使用核苷酸引物扩增表达目标单克隆抗体的基因的可变区。这些引物可以由本领域普通技术人员合成, 或可以购自商业上可获得的来源。(参见, 例如, Stratagene (La Jolla, California), 其销售用于小鼠和人可变区的引物, 特别地包括用于 V<sub>Ha</sub>、V<sub>Hb</sub>、V<sub>Hc</sub>、V<sub>Hd</sub>、C<sub>H1</sub>、V<sub>L</sub> 和 C<sub>L</sub> 区的引物)。这些引物可以用于扩增重链或轻链可变区, 其随后可以插入载体中, 如分别插入 ImmunoZAP<sup>TM</sup>H 和 ImmunoZAP<sup>TM</sup>L (Stratagene) 中。这些载体随后可以引入用于表达的大肠杆菌、酵母或基于哺乳动物的系统中。使用这些方法可以产生大量含有 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域的融合的单链蛋白 (参见 Bird 等, Science 242:423-426, 1988)。

[0369] 一旦使用上述任一种免疫和其他技术获得根据本发明的产生抗体的细胞, 则可以根据本文中所述的标准程序, 通过从其分离和扩增 DNA 或 mRNA 来克隆特定抗体基因。可以将从其产生的抗体测序并鉴别 CDR, 并且可以按照之前所述地操纵编码 CDR 的 DNA 以产生根

据本发明的其他抗体。

[0370] 本发明的激活素 A 结合剂优选在本文中所述的基于细胞的试验和 / 或本文中所述的体内试验中介导激活素 A 功能和 / 或结合本文中所述的一个或多个半胱氨酸结构域和 / 或交叉阻断本申请中所述的抗体之一的结合和 / 或由本申请所述的抗体之一结合激活素 A 被交叉阻断。因此,可以使用本文中所述的试验来鉴别这样的结合剂。

[0371] 在特定的实施方案中,通过首先鉴别结合本文中提供的一个或多个半胱氨酸结构域的和 / 或在本文中所述的基于细胞的和 / 或体内试验中中和的和 / 或交叉阻断本申请中所述的抗体和 / 或由本申请所述抗体之一结合激活素 A 被交叉阻断的抗体来产生抗体。来自这些抗体的 CDR 区然后用于插入合适的生物相容性框架中以产生激活素 A 结合剂。结合剂的非 CDR 部分可以由氨基酸组成,或可以是非蛋白质分子。本文中所述的试验允许结合剂的表征。优选地,本发明的结合剂是如本文中限定的抗体。

[0372] 可以按照本文中所述的本领域已知的常规免疫和细胞融合程序来获得根据本发明的其他抗体。

[0373] 抗体结合位点中心的互补决定区 (CDR) 的分子演变也已经用于分离具有提高的亲亲和性的抗体,例如,对 c-erbB-2 具有提高的亲亲和性的抗体,如 Schier 等,1996, J. Mol. Biol. 263:551 所述的。因此,这样的技术可用于制备激活素 A 的抗体。针对激活素 A 的抗原结合蛋白可以用于例如体外或体内检测激活素 A 多肽存在的试验中。抗原结合蛋白还可以用于通过免疫亲和性色谱纯化激活素 A 蛋白。

[0374] 本发明的抗原结合蛋白(例如,抗体、抗体片段和抗体衍生物)可以包含本领域已知的任何恒定区。轻链恒定区可以是例如  $\kappa$ - 或  $\lambda$ - 型轻链恒定区,例如,人  $\kappa$ - 或  $\lambda$ - 型轻链恒定区。重链恒定区可以是,例如,  $\alpha$ -、 $\delta$ -、 $\epsilon$ -、 $\gamma$ - 或  $\mu$ - 型重链恒定区,例如,人  $\alpha$ -、 $\delta$ -、 $\epsilon$ -、 $\gamma$ - 或  $\mu$ - 型重链恒定区。在一个实施方案中,轻链或重链恒定区是天然产生的恒定区的片段、衍生物、变体或突变蛋白。

[0375] 用于从目标抗体衍生不同亚类或同种型的抗体的技术是已知的,即,亚类转换。因此,例如,IgG 抗体可以源自 IgM 抗体,反之亦然。这样的技术允许制备具有给定抗体(亲本抗体)的抗原结合特性但还呈现与亲本抗体不同的抗体同种型或亚类相关的生物特性的新抗体。可以使用重组 DNA 技术。编码特定抗体多肽的克隆的 DNA 可以用于这样的程序中,例如,编码所需同种型的抗体的恒定结构域的 DNA。还可以参见 Lantto 等,2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16。

[0376] 在一个实施方案中,本发明的抗原结合蛋白包含 A1-A14(H1-H14) 任一个的 IgG1 重链结构域或 A1-A14(H1-H14) 任一个的 IgG1 重链结构域的片段。在另一个实施方案中,本发明的抗原结合蛋白包含 A1-A14(L1-L14) 的  $\kappa$  轻链恒定区或 A1-A14(L1-L14) 的  $\kappa$  轻链恒定区的片段。在另一个实施方案中,本发明的抗原结合蛋白包含 A1-A14(L1-L14) IgG1 重链结构域或其片段和 A1-A14(L1-L14) 的  $\kappa$  轻链结构域或其片段。

[0377] 因此,本发明的抗原结合蛋白包括包含例如可变结构域组合 L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13 和 L14H14 的那些,其具有所需同种型(例如,IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE 和 IgD) 以及其 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。此外,如果需要 IgG4,还可能需要在铰链区引入点突变(CPSCP→CPPCP),如 Bloom 等,1997, Protein Science 6:407 中所述,其按引用并入本文中,以减轻形成可能导致 IgG4 抗

体的异质性的 H 链内二硫键的倾向。

[0378] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白具有  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  或更低的  $K_{\text{off}}$ 。在另一个实施方案中,  $K_{\text{off}}$  是  $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$  或更低。在另一个实施方案中,  $K_{\text{off}}$  与具有选自 L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13 和 L14H14 的轻链和重链可变结构域序列组合的抗体基本相同。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白以与包含一个或多个来自具有选自 L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13 和 L14H14 的组合组的轻链和重链可变结构域序列组合的抗体的 CDR 的抗体基本上相同的  $K_{\text{off}}$  结合激活素 A。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白以与包含一个如上所示氨基酸序列的抗体基本上相同的  $K_{\text{off}}$  结合激活素 A。在另一个实施方案中,抗原结合蛋白以与包含来自包括一个如上所示氨基酸序列的抗体的一个或多个 CDR 的抗体基本上相同的  $K_{\text{off}}$  结合激活素 A。

[0379] 尽管人、部分人或人源化抗体适合于许多应用,特别是涉及将抗体施用于人受试者的那些,但其他类型的抗原结合蛋白适合于特定应用。本发明的非人抗体可以是,例如,源自任何抗体产生动物,如小鼠、大鼠、兔、山羊、驴或非人灵长类(如猴子(例如,食蟹猴(cynomologous)或猕猴)或猿(例如,黑猩猩))。本发明的非人抗体可以用于例如体外或基于细胞培养物的应用,或其中对本发明抗体的免疫应答没发生、不显著、可以预防、不是关注问题或所需的任何其他应用中。在一个实施方案中,将本发明的非人抗体施用于非人受试者。在另一个实施方案中,非人抗体没有在非人受试者中引发免疫应答。在另一个实施方案中,非人抗体来自与非人受试者相同的物种,例如,将本发明的小鼠抗体施用于小鼠。例如,可以通过用所需免疫原(例如,可溶性激活素 A 多肽)免疫特定物种的动物或使用用于产生该物种的抗体的人工系统(例如,用于产生特定物种的抗体的基于细菌或噬菌体的系统),或通过例如用来自其他物种的恒定区替代抗体的恒定区将来自一个物种的抗体转化成来自另一个物种的抗体,或通过替换抗体的一个或多个氨基酸残基使其更接近地类似于来自该其他物种的抗体序列而制得来自该特定物种的抗体。在一个实施方案中,抗体是包含源自两个或更多个不同物种的抗体的氨基酸序列的嵌合抗体。

[0380] 可以通过多种常规技术中的任何一种来制备抗原结合蛋白,并针对所需特性进行筛选。特定的技术涉及分离编码目标抗原结合蛋白(例如,抗激活素 A 抗体)的多肽链(或其部分)的核酸,并通过重组 DNA 技术操纵该核酸。例如,可以将核酸与另一目标核酸融合,或改变(例如,通过突变或其他常规技术)以来添加、删除或置换一个或多个氨基酸残基。此外,抗原结合蛋白可以使用本领域已知的任何技术将从天然表达它们的细胞中纯化(例如,抗体可以从产生该抗体的杂交瘤纯化)或在重组表达系统中产生。参见,例如, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses* (单克隆抗体, 杂交瘤: 生物分析中的新维度), Kennet 等(编辑), Plenum Press, New York (1980); 和 *Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体: 实验室手册), Harlow 和 Land (编辑), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)。

[0381] 本领域已知的任何表达系统可以用于制备本发明的重组多肽。以上全面地详细描述了表达系统。通常,用包含编码所需多肽的 DNA 的重组表达载体转化宿主细胞。可以使用的宿主细胞包括原核生物、酵母或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如,大肠杆菌或芽孢杆菌(Bacilli)。高等真核细胞包括昆虫细胞和确定的哺

乳动物来源的细胞系。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞的 COS-7 系 (ATCC CRL 1651) (Gluzman 等, 1981, *Cell* 23:175)、L 细胞、293 细胞、C127 细胞、3T3 细胞 (ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、BHK (ATCC CRL 10) 细胞系和源自非洲绿猴肾细胞系 CV1 (ATCC CCL 70) 的 CV1/EBNA 细胞系, 如 McMahan 等, 1991, *EMBO J.* 10:2821 所述的。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的合适的克隆和表达载体由 Pouwels 等描述 (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (克隆载体: 实验室手册), Elsevier, New York, 1985)。

[0382] 可以在促进多肽表达的条件下培养转化的细胞, 并通过常规蛋白质纯化程序 (如以上限定的) 来回收多肽。一种这样的纯化程序包括使用亲和色谱, 例如, 在具有其上结合的激活素 A 的全部或一部分 (例如, 胞外结构域) 的基质上纯化。考虑用于本文中的多肽包括基本上不含污染内源性物质的基本上同质的重组哺乳动物抗激活素 A 抗体多肽。

[0383] 在一个方面中, 本发明提供了本发明的抗激活素 A 抗体的抗原结合片段。这样的片段可以完全由抗体源的序列组成或可以包含另外的序列。抗原结合片段的实例包括 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、四特异性抗体和结构域抗体。Lunde 等, 2002, *Biochem. Soc. Trans.* 30:500-06 中提供了其他实例。

[0384] 可以通过经由氨基酸桥 (短的肽接头, 例如, 合成的氨基酸残基序列) 连接重链和轻链可变结构域 (Fv 区) 片段来形成单链抗体 (scFv), 从而形成单多肽链。已经通过融合编码两个可变结构域多肽 (V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub>) 的 DNA 之间的编码肽接头的 DNA 来制备这样的单链 Fv (scFv)。所得到的多肽可以自身折回以形成抗原结合单体, 或它们可以形成多聚物 (例如, 二聚物、三聚物或四聚物), 取决于两个可变结构域之间的柔性接头的长度 (Kortt 等, 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt 等, 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108, Bird 等, 1988, *Science* 242:423-26 和 Huston 等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83)。通过组合不同的包含 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 的多肽, 可以形成结合不同表位的多聚 scFv (Kriangkum 等, 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40)。为了生产单链抗体研发的技术包括美国专利 No. 4, 946, 778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston 等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward 等, 1989, *Nature* 334:544, de Graaf 等, 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87 中所述的那些。源自本文中提供的抗体的单链抗体包括, 但不限于, 包含可变结构域组合 L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13 和 L14H14 的 scFv, 其包括在本发明内。

[0385] 双特异性抗体是包括两条多肽链的二价抗体, 其中每条多肽链包含由接头连接的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域, 所述接头太短以致不允许相同链上的两个结构域之间配对, 因此使得每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对 (参见, 例如, Holliger 等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 和 Poljak 等, 1994, *Structure* 2:1121-23)。如果双特异性抗体的两条多肽链是相同的, 那么从它们的配对得到的双特异性抗体将具有两个相同的抗原结合位点。具有不同序列的多肽链可以用于制备具有两个不同抗原结合位点的双特异性抗体。相似地, 三特异性抗体和四特异性抗体分别是包括三条和四条多肽链的抗体, 并分别形成三个和四个抗原结合位点 (其可以相同或不同)。

[0386] 抗体多肽还公开于美国专利 No. 6, 703, 199 中, 包括纤连蛋白多肽 monobodies。其他抗体多肽公开于美国专利公开 2005/0238646 中, 其是单链多肽。

[0387] 在特定的优选实施方案中,抗体包含一个或多个水溶性聚合物附接物,包括但不限于,聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。参见,例如,美国专利 No. 4, 640, 835、4, 496, 689、4, 301, 144、4, 670, 417、4, 791, 192 和 4, 179, 337。在特定的实施方案中,衍生物结合剂包括单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纤维素或其他基于碳水化合物的聚合物、聚-(N- 乙烯吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如,丙三醇)和聚乙烯醇以及这些聚合物的混合物中的一种或多种。在特定的实施方案中,一种或多种水溶性聚合物随机连接于一条或多条侧链。在特定的实施方案中,PEG 可以用于提高结合剂(如抗体)的治疗能力。某些这样的方法在例如美国专利 No. 6, 133, 426 中有讨论,将其按引用并入本文中用于任何目的。

[0388] 将认识到本发明的抗体可以具有至少一个氨基酸置换,只要抗体保留结合特异性。因此,抗体结构的改变包括在本发明的范围内。这些可以包括不破坏抗体的激活素 A 结合能力的氨基酸置换,其可以是保守性的或非保守性的。保守性氨基酸置换可以包括非天然产生的氨基酸残基,其通常通过化学肽合成而不是通过在生物系统中的合成来并入。这些包括肽模拟物和氨基酸部分的其他反向或翻转形式。保守性氨基酸置换也可以涉及用标准残基置换天然氨基酸残基,以使得对该位置处氨基酸残基的极性或电荷具有很少或没有影响。

[0389] 非保守性置换可以涉及一类氨基酸或氨基酸模拟物的成员与来自具有不同物理特性(例如,大小、极性、疏水性、电荷)的另一类的成员交换。可以将这类置换的残基引入人抗体的与非人抗体同源的区域中,或引入分子的非同源区域中。

[0390] 此外,本领域技术人员可以产生在各个所需氨基酸残基处含有单氨基酸置换的测试变体。然后可以使用本领域技术人员已知的活性试验来筛选变体。这样的变体可以用于收集关于合适变体的信息。例如,如果发现了特定氨基酸残基的变化导致了破坏的、不合需要地降低的,或不合适的活性,则可以避免具有这种变化的变体。换句话说,基于从此类常规实验收集的信息,本领域技术人员可以容易地确定其中应当避免进一步置换的氨基酸,不管是单独的或与其他突变结合。

[0391] 本领域技术人员将能够使用公知技术来确定本文中列出的多肽的合适变体。在特定的实施方案中,本领域技术人员可以通过靶向认为对活性不重要的区域来鉴别可以改变而不破坏活性的合适分子区域。在特定的实施方案中,可以鉴别在相似多肽中保守的分子残基和部分。在特定的实施方案中,甚至对生物活性或结构重要的区域可以进行保守性氨基酸置换而不破坏生物活性或没有不利地影响多肽结构。

[0392] 另外,本领域技术人员可以回顾鉴别相似多肽中对活性或结构重要的残基的结构-功能研究。由于这样的比较,可以预测蛋白质中与相似蛋白质中对活性或结构重要的氨基酸残基对应的氨基酸残基的重要性。本领域技术人员可以对于这样的预测重要的氨基酸残基选择化学上相似的氨基酸置换。

[0393] 本领域技术人员还可以分析相似多肽中的三维结构和与该结构相关的氨基酸序列。鉴于此类信息,本领域技术人员可以预测抗体关于其三维结构的氨基酸残基的排列。在特定的实施方案中,本领域技术人员可以选择对预测为在蛋白质表面上的氨基酸残基不作根本变化,因为这样的残基可能涉及与其他分子的重要相互作用。

[0394] 多种科学出版物已经致力于二级结构的预测。参见, Moulton J., Curr. Op. in Bi

otech., 7(4):422-427(1996), Chou et al., Biochem., 13(2):222-245(1974); Chou 等, Biochem., 113(2):211-222(1974); Chou 等, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chou 等, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 和 Chou 等, Biophys. J., 26:367-384(1979)。此外, 计算机程序目前可用于辅助预测二级结构。一种预测二级结构的方法是基于同源性建模。例如, 具有高于 30% 的序列同一性或高于 40% 的相似性的两个多肽或蛋白质常常具有相似的结构拓扑学。蛋白质结构数据库 (PDB) 最近的进展已经提供了增强的二级结构预测性, 包括多肽或蛋白质结构内的潜在折叠数。参见 Holm 等, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)。已经表明 (Brenner 等, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997)) 给定的多肽或蛋白质中存在有限数量的折叠并且一旦已经解析关键数量的结构, 结构的预测将明显变得更准确。

[0395] 预测二级结构的其他方法包括“串线 (threading)” (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); Sippl 等, Structure, 4(1):15-19(1996))、 “谱分析 (profile analysis)” (Bowie 等, Science, 253:164-170(1991); Gribskov 等, Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskov 等, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987)) 和“进化连锁 (evolutionary linkage)” (参见 Holm, 上文 (1999) 和 Brenner, 上文 (1997))。

[0396] 在特定的实施方案中, 抗体的变体包括糖基化变体, 其中与亲本多肽的氨基酸序列相比, 糖基化位点的数量和 / 或类型已经改变。在特定的实施方案中, 变体包括比天然蛋白质更多或更少数量的 N- 连接糖基化位点。N- 连接糖基化位点的特征在于序列: Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, 其中表示为 X 的氨基酸残基可以是任何氨基酸残基, 除了脯氨酸。产生这个序列的氨基酸残基的置换对于添加 N- 连接的碳水化合物链提供了潜在的新位点。或者, 消除这个序列的置换将除去现有的 N- 连接的碳水化合物链。还提供了 N- 连接的碳水化合物链的重排, 其中一个或多个 N- 连接糖基化位点 (通常是天然产生的那些) 消除和一个或多个新的 N- 连接位点形成。另外优选的抗体变体包括半胱氨酸变体, 其中与亲本氨基酸序列相比, 一个或多个半胱氨酸残基删除或替代为另一个氨基酸 (例如, 丝氨酸)。当抗体必需重新折叠成生物活性构象时, 如分离不溶性包涵体后, 半胱氨酸变体是有用的。半胱氨酸变体与天然蛋白质相比通常具有较少的半胱氨酸残基, 并且通常具有偶数个以最小化由未配对半胱氨酸引起的相互作用。

[0397] 所需的氨基酸置换 (不管是保守性的或是非保守性的) 可以由本领域技术人员在需要这样的置换时来确定。在特定的实施方案中, 氨基酸置换可以用于鉴别激活素 A 的抗体的重要残基, 或用于提高或降低抗体与本文中所述的激活素 A 的亲合性。

[0398] 根据特定的实施方案, 优选的氨基酸置换是以下的那些: (1) 降低对蛋白质水解的易感性, (2) 降低对氧化的易感性, (3) 改变用于形成蛋白质复合物的结合亲和性, (4) 改变结合亲和性, 和 / 或 (4) 赋予或改变此类多肽的其他物理化学或功能特性。根据特定的实施方案, 可以在天然产生的序列中 (在特定实施方案中, 在形成分子间接触的结构域外的多肽部分中) 形成单一或多氨基酸置换 (在特定的实施方案中, 保守性氨基酸置换)。在特定的实施方案中, 保守性氨基酸置换通常可以基本上不改变亲本序列的结构特征 (例如, 替代氨基酸应当不倾向于破坏亲本序列中存在的螺旋, 或破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级和三级结构的实例描述于 Proteins, Structures



and Molecular Principles(蛋白质、结构和分子原理)(Creighton编辑,W. H. Freeman and Company, New York(1984)); Introduction to Protein Structure(蛋白质结构的介绍)(C. Branden和J. Tooze编辑, Garland Publishing, New York, N. Y. (1991))和Thornton等, Nature 354:105(1991),其各自按引用并入本文中。

[0399] 在特定的实施方案中,本发明的抗体可以与聚合物、脂质或其他部分化学地键合。

[0400] 结合剂可以包含并入生物相容性框架结构中的本文中所描述的至少一个 CDR。在一个实例中,生物相容性框架结构包含足以形成构象上稳定的结构支持物或框架或支架的多肽或其部分,其能够呈现结合局部表面区域中的抗原(例如,CDR,可变区等)的一个或多个氨基酸序列。这样的结构可以是天然产生的多肽或多肽“折叠”(结构基序),或相对于天然产生的多肽或折叠可以具有一个或多个改变,如氨基酸的添加、删除或置换。这些支架可以源自任何物种(或超过一个物种)的多肽,如人、其他哺乳动物、其他脊椎动物、无脊椎动物、植物、细菌或病毒。

[0401] 通常,生物相容性框架结构基于除了免疫球蛋白结构域以外的蛋白质支架或骨架。例如,可以使用基于纤连蛋白、锚蛋白、载脂蛋白、新制癌菌素(neocarzinostatin)、细胞色素 b、CP1 锌指、PST1、卷曲螺旋、LACI-D1、Z 结构域和淀粉酶抑制肽(tendamistat)结构域的那些(参见,例如,Nygren和Uhlen,1997,Curr. Opin. in Struct. Biol., 7, 463-469)。

[0402] 将认识到本发明的抗体包括本文中所述的人源化抗体。可以使用本领域技术人员已知的技术来产生人源化抗体,如本文中所述的那些(Zhang, W. 等, Molecular Immunology. 42(12):1445-1451, 2005; Hwang W. 等, Methods. 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua WF 等, Methods 36(1):43-60, 2005 和 Clark, M., Immunology Today. 21(8):397-402, 2000)。

[0403] 另外,本领域技术人员将认识到合适的结合剂包括这些抗体的部分,如本文中具体公开的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 中的一个或多个。CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的至少一个区域可以具有至少一个氨基酸置换,只要抗体保留未置换 CDR 的结合特异性。抗体的非-CDR 部分可以是非-蛋白质分子,其中结合剂交叉阻断本文中公开的抗体与激活素 A 的结合和/或中和激活素 A。抗体的非-CDR 部分可以是非蛋白质分子,其中抗体在竞争结合试验中呈现出与抗体 A1-A14 中的至少一个呈现的相似的对于人激活素 A 肽的结合模式,和/或中和激活素 A。抗体的非-CDR 部分可以由氨基酸组成,其中抗体是重组结合蛋白或合成肽,并且重组结合蛋白交叉阻断本文中公开的抗体与激活素 A 的结合和/或中和激活素 A。抗体的非-CDR 部分可以由氨基酸组成,其中抗体是重组抗体,并且重组抗体在人激活素 A 肽表位竞争结合试验(下文中描述的)中呈现出与抗体 A1-A14 中至少一个呈现的相似人激活素 A 肽结合模式,和/或中和激活素 A。

[0404] 在抗体包含以上所述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 中的一个或多个的情况下,可以通过由含有编码这些序列的 DNA 的宿主细胞表达来获得。可以基于 CDR 的氨基酸序列来确定编码每个 CDR 序列的 DNA,并按照国家使用寡核苷酸合成技术、定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术与任何所需的抗体可变区框架和恒定区 DNA 序列一起合成。本领域技术人员从遗传序列数据库如 GenBank® 可以广泛地获得编码可变区框架和恒定区的 DNA。

[0405] 一旦合成,可以使用多种已知的表达载体,根据多种公知的用于核酸切割、连接、

转化和转染的程序中的任何一种来增殖和表达编码本发明抗体或其片段的 DNA。因此,在特定的实施方案中,抗体片段的表达可以优选在原核宿主(如大肠杆菌)中(参见,例如,Pluckthun 等,1989Methods Enzymol. 178:497-515)。在特定的其他实施方案中,抗体或其片段的表达可以优选在真核宿主细胞中,包括酵母(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*))、动物细胞(包括哺乳动物细胞)或植物细胞。合适的动物细胞的实例包括,但不限于,骨髓瘤(如小鼠 NSO 系)、COS、CHO 或杂交瘤细胞。植物细胞的实例包括烟草、玉米、大豆和水稻细胞。

[0406] 可以制备一个或多个含有编码抗体可变区和 / 或恒定区的 DNA 的可复制表达载体并用于转化合适的细胞系,例如,非生产骨髓瘤细胞系,如小鼠 NSO 系,或细菌,如大肠杆菌,其中将进行抗体的生产。为了获得有效的转录和翻译,每个载体中的 DNA 序列应当包括合适的调控序列,特别是可操作地连接可变结构域序列的启动子和前导序列。以这种方式产生抗体的特定方法通常是公知的和常规使用的。例如,由 Maniatis 等描述了基础分子生物学程序(Molecular Cloning, A Laboratory Manual(分子克隆,实验室手册),第 2 版,冷泉港实验室,纽约,1989;还可以参见 Maniatis 等,第 3 版,冷泉港实验室,纽约,(2001))。可以按照 Sanger 等(PNAS 74:5463, (1977))和 Amersham International plc 测序手册所述的进行 DNA 测序,并且可以根据本领域已知的方法进行定点诱变(Kramer 等, Nucleic Acids Res. 12:9441, (1984); Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92(1985); Kunkel 等, Methods in Enzymol. 154:367-82(1987); the Anglian Biotechnology Ltd. Handbook)。另外,多种出版物描述了适用于通过 DNA 的操纵、表达载体的形成以及合适细胞的转化和培养来制备抗体的技术(Mountain A 和 Adair, J R, 见 Biotechnology and Genetic Engineering Reviews(生物技术和遗传工程概览)(编辑 Tombs, M P, 10, 第 1 章, 1992, Intercept, Andover, UK); “Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学通用实验方案)”, 1999, F. M. Ausubel(编辑), Wiley Interscience, New York)。

[0407] 在希望提高根据本发明的抗体的亲和性的情况中,包含一个或多个上述 CDR 可以通过多种亲和性成熟实验方案来获得,包括保持 CDR(Yang 等, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、链改组(Marks 等, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、使用大肠杆菌的突变株(Low 等, J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996)、DNA 改组(Patten 等, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、噬菌体展示(Thompson 等, J. Mol. Biol., 256, 7-88, 1996)和有性 PCR(Cramer 等, Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan 等讨论了所有这些亲和性突变方法(Nature Biotech., 16, 535-539, 1998)。

[0408] 本领域技术人员将理解一些蛋白质,如抗体,可以进行各种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度常常取决于用于表达蛋白质的宿主细胞系以及培养条件。这样的修饰可以包括糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺的变化。常见的修饰是由于羧基肽酶的作用失去羧基端碱性残基(如亮氨酸或精氨酸)(如 Harris, R. J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995 中所述的)。

[0409] svActRIIB: 激活素 IIB 受体

[0410] 本发明公开了包括稳定化的人激活素 IIB 受体(svActRIIB)多肽的分离蛋白。本发明的蛋白质和多肽的特征在于其结合三种 TGF- $\beta$  蛋白(肌肉生长抑制剂(GDF-8)、激活

素 A 或 GDF-11) 中至少一种,抑制这些蛋白质中至少一种的活性以及与其他 ActRIIB 可溶性受体相比提高可制造特性的能力。稳定化的人激活素 IIB 受体多肽的特征在于相对于 ActRIIB 的胞外结构域在位置 E28 和 S44 处的氨基酸置换,如以下序列中所示:Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr (SEQ ID NO:2)。在一个实施方案中,稳定化的人激活素 IIB 受体多肽相对于以上序列还可以在位置 64 处具有丙氨酸的置换。

[0411] “TGF- $\beta$  家族成员”或“TGF- $\beta$  蛋白”是指转化生长因子家族的结构上相关的生长因子,包括激活素,以及生长和分化因子 (GDF) 蛋白 (Kingsley 等, *Genes Dev.* 8:133-146(1994), McPherron 等, *Growth factors and cytokines in health and disease* (健康和疾病中的生长因子和细胞因子), Vol. 1B, D. LeRoith 和 C. Bondy 编辑, JAI Press Inc., Greenwich, Conn, USA: pp 357-393)

[0412] GDF-8, 也称为肌肉生长抑制剂,是骨骼肌肉组织的负调节剂 (McPherron 等, *PNAS USA* 94:12457-12461(1997))。肌肉生长抑制剂作为大约 375 个氨基酸长度的无活性蛋白质合成,对于人具有 GenBank Accession No:AAB86694。前体蛋白质通过四碱基处理位点的蛋白质水解切割以产生 N-端无活性前结构域和大约 109 个氨基酸的 C-端蛋白(其二聚化形成约 25kDa 的同型二聚体)而激活。这个同型二聚体是成熟的、生物活性的蛋白 (Zimmers 等, *Science* 296,1486(2002))。

[0413] “前结构域”或“前肽”是无活性的 N-端蛋白,其切割掉以释放活性 C-端蛋白。如本文中使用的,术语“肌肉生长抑制剂”或“成熟肌肉生长抑制剂”是指成熟的、生物活性的 C-端多肽(为单体、二聚体或其他形式)以及生物活性片段或相关多肽(包括等位基因变体、剪接变体以及融合肽和多肽)。已经报道了成熟肌肉生长抑制剂在许多物种中具有 100% 序列同一性,包括人、小鼠、鸡、猪、火鸡和大鼠 (Lee 等, *PNAS* 98,9306(2001))。

[0414] GDF-11 是指具有 Swissprot 登录号 095390 的 BMP(骨形态发生蛋白)以及该蛋白质的变体和物种同源物。GDF-11 涉及中轴骨的前/后模式形成的调控 (McPherron 等, *Nature Genet.* 22(93):260-264(1999); Gamer 等, *Dev. Biol.* 208(1), 222-232(1999)), 但出生后功能是未知的。

#### [0415] 受体多肽

[0416] 激活素 IIB 型受体 (ActRIIB) 可以是具有登录号 NP\_001097 的人激活素受体或其变体,如位置 64 处的精氨酸用丙氨酸置换的。术语可溶性 ActRIIB(野生型)是指 ActRIIB 的胞外结构域,SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 134(具有信号序列)或氨基酸 19 至 134(无信号序列)。

[0417] 本发明提供了包括稳定化的 ActIIB 受体多肽(在本文中称为“svActRIIB 多肽”)的分离蛋白。“svActRIIB 蛋白质”是包括稳定化的 ActRIIB 多肽的蛋白质。术语“分离的”是指从内源性材料纯化至一定程度的蛋白质或多肽分子。除了具有提高的可制造性特征,

这些多肽和蛋白质在于具有结合并抑制激活素 A、肌肉生长抑制剂或 GDF-11 中任何一种的活性的能力。

[0418] 稳定化的 ActRIIB 多肽的特征在于相对于 SEQ ID NO:2 在位置 28 和 44 处具有氨基酸置换。为了一致性,稳定化的 ActRIIB 多肽和蛋白质上的氨基酸位置总是相对于 SEQ ID NO:2 中的位置来提及,与多肽是成熟的或是截短的无关。如本文中使用的,术语“成熟的”是指不含其信号序列的多肽或肽。如本文中使用的,术语“截短的”是指除去了 N 端氨基酸或 C 端氨基酸的多肽。

[0419] 在一个实施方案中,分离的稳定化的激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB) 具有 SEQ ID NO:2 中所示的多肽序列,除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,且位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中,多肽具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 19 至 134 所示的序列,除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,且位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中,多肽具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 23 至 134 所示的序列,除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,且位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中,多肽具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 25 至 134 所示的序列,除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,且位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中,多肽具有与以上任一个多肽具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列,其中多肽具有位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,且位置 44 处的置换是 T,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。在一个实施方案中,以上多肽在位置 28 处的置换是 W,且位置 44 处的置换是 T,其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。

[0420] 在一个实施方案中,svActRIIB 多肽包括信号序列,例如,SEQ ID NO:4、8、12 和 16(序列参见下文)。然而,各种信号肽可以用于本申请的多肽的制备中。信号肽可以具有例如 SEQ ID NO:4 的氨基酸 1 至 19 所示的序列,或 SEQ ID NO:31 和 32 中所示的信号序列。可以使用用于表达 svActRIIB 多肽的任何其他信号肽。在其他实施方案中,除去信号序列而留下成熟肽。缺乏信号序列的 svActRIIB 多肽的实例包括例如 SEQ ID NO:6、10、14 和 18。

[0421] 在一个实施方案中,蛋白质包括稳定化的激活素 IIB 受体多肽,其中多肽选自具有 SEQ ID NO:4、6、12 和 14 所示的序列的多肽。这些多肽代表 SEQ ID NO:2 的氨基酸 25 至 134,其中多肽具有位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,且位置 44 处的置换是 T,并且多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11,具有或不具有不同于 SEQ ID NO:2 中所示的信号序列。在另一个实施方案中,蛋白质包括与 SEQ ID NO:4、6、12 或 14 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的多肽,其中多肽具有位置 28 处的 W 或 Y 和位置 44 处的 T,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。在一个实施方案中,位置 28 处的置换是 W 和位置 44 处的置换是 T,其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。

[0422] 在进一步的实施方案中,svActRIIB 蛋白进一步包括异源蛋白。在一个实施方案中,异源蛋白是 Fc 结构域。在进一步的实施方案中,Fc 结构域是人 IgG Fc 结构域。在一

个实施方案中,蛋白质包括具有 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 的组中所示序列的多肽。在另一个实施方案中,蛋白质包括与 SEQ ID NO:8、10、16 或 18 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的多肽,其中多肽具有位置 28 处的 W 或 Y 和位置 44 处的 T,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。在一个实施方案中,位置 28 处的置换是 W 和位置 44 处的置换是 T,其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。

[0423] 在进一步的实施方案中,蛋白质包括以上所述多肽中的任何一个,其中位置 64 处的氨基酸残基是丙氨酸。

[0424] 在另一个实施方案中,术语 svActRIIB 多肽和蛋白质包括包含 SEQ ID NO:2、4、6、12 和 14 的片段的蛋白质,包括 N 和 C 端截短,其中位置 28 处是 W 或 Y,且位置 44 处是 T,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 -A 或 GDF-11。

[0425] 术语 svActRIIB 多肽的“衍生物”是指至少一个另外的化学部分或至少一个另外多肽的连接以形成共价或聚集缀合物,如糖基基团、脂质、乙酰基基团或者 C-端或 N-端融合多肽,与 PEG 分子缀合,和以下更全面地详细描述的其他修饰。稳定化的 ActRIIB 受体多肽还可以包括其他修饰和衍生物,包括 C 和 N 端的修饰,其是由于在各种细胞类型(如哺乳动物细胞、大肠杆菌、酵母和其他重组宿主细胞)中的表达引起的加工而产生。

[0426] 本发明的 svActRIIB 蛋白可以进一步包括直接或通过接头序列连接于 svActRIIB 多肽的异源多肽,以形成融合蛋白。如本文中使用的,术语“融合蛋白”是指具有通过重组 DNA 结合连接的异源多肽的蛋白质。异源多肽包括但不限于 Fc 多肽、his 标签和亮氨酸拉链结构域,以促进稳定化的 ActRIIB 多肽的寡聚化和进一步稳定,如例如 W000/29581 中所述的,其按引用并入本文中。在一个实施方案中,异源多肽是 Fc 多肽或结构域。在一个实施方案中,Fc 结构域选自人 IgG1Fc(SEQ ID NO:23)、修饰的 IgG1Fc(SEQ ID NO:47)、IgG2Fc(SEQ ID NO:22) 和 IgG4Fc(SEQ ID NO:24) 结构域。svActRIIB 蛋白可以进一步包括 IgG1(SEQ ID NO:29)、IgG2(SEQ ID NO:28) 或 IgG4(SEQ ID NO:30) 的全部或部分铰链序列。示例性 svActRIIB 多肽选自由 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 所示序列组成的多肽,以及与这些序列具有实质相似性的那些多肽,其中保留位置 28 和 44 处的置换。如本文中使用的,“实质相似性”是指与 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 中的任一个为至少 80% 相同、85% 相同、90% 相同、95% 相同、96% 相同、97% 相同、98% 相同、99% 相同的序列,其中多肽保留位置 28 处的 W 或 Y 和位置 44 处的 T,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。在一个实施方案中,位置 28 处的置换是 W 且位置 44 处的置换是 T,其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

[0427] svActRIIB 多肽可以任选地进一步包含“接头”序列。接头主要用作多肽和第二异源多肽或其他类型的融合体之间或者两个或更多个稳定化的 ActRIIB 多肽之间的间隔物。在一个实施方案中,接头由通过肽键连接在一起的氨基酸构成,优选由通过肽键连接的 1 至 20 个氨基酸构成,其中氨基酸选自 20 种天然产生的氨基酸。这些氨基酸中的一个或多个可以糖基化,如本领域技术人员所理解的。在一个实施方案中,1 至 20 个氨基酸可以选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸。在一个实施方案中,接头由大部分非空间位阻的氨基酸(如甘氨酸和丙氨酸)构成。示例性接头是聚甘氨酸(特别是 (Gly)<sub>5</sub>(SEQ ID NO:289)、(Gly)<sub>8</sub>(SEQ ID NO:290))、聚(Gly-Ala) 和聚丙氨酸。以下实

施例中显示的一种示例性的合适接头为 (Gly)<sub>4</sub>Ser (SEQ ID NO:25)。在进一步的实施方案中, svActRIIB 可以包括“铰链接头”, 即邻近 IgG 的铰链区或部分铰链区提供的接头序列, 如 SEQ ID NO:27 中举例说明的。铰链序列包括 IgG2Fc (SEQ ID NO:28)、IgG1Fc (SEQ ID NO:29) 和 IgG4Fc (SEQ ID NO:30)。

[0428] 铰链接头序列还可以设计成提高 svActRIIB-Fc 蛋白的可制造性和稳定性。在一个实施方案中, 在连接 svActRIIB 多肽时, 将 SEQ ID NO:27、38、40、42、44、45 和 46 的铰链接头用 IgG2Fc (SEQ ID NO:22) 设计为提高可制造性。在一个实施方案中, 在将 svActRIIB 多肽连接于人 IgG1Fc (SEQ ID NO:23) 或修饰的人 IgG1Fc (SEQ ID NO:47) 时, 将铰链接头序列设计为提高可制造性, 例如, 具有 SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50 的铰链接头。

[0429] 接头还可以是非-肽接头。例如, 可以使用烷基接头, 如 -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-C(O)-, 其中 s = 2-20。这些烷基接头可以进一步被任何非空间位阻基团取代, 如低级烷基 (例如, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)、低级酰基、卤素 (例如, Cl、Br)、CN、NH<sub>2</sub>、苯基等。

[0430] 本文中公开的 svActRIIB 多肽还可以连接于非-多肽分子用于赋予所需特性的目的, 如降低 svActRIIB 多肽的降解和 / 或提高半衰期、降低毒性、降低致免疫性和 / 或提高生物活性。示例性分子包括但不限于线性聚合物, 如聚乙二醇 (PEG)、聚赖氨酸、葡聚糖; 脂质; 胆固醇基团 (如类固醇); 碳水化合物或寡糖分子。

[0431] 与其他 ActRIIB 可溶性多肽相比, svActRIIB 蛋白和多肽具有提高的可制造性特性。如本文中使用的, 术语“可制造性”是指特定蛋白质的重组表达和纯化过程中该蛋白质的稳定性。据认为可制造性是由于在表达和纯化条件下分子的内在特性引起的。

[0432] svActRIIB 多肽的活性包括, 但不限于, 结合肌肉生长抑制剂或激活素 A 或 GDF-11 的能力, 以及抑制或中和肌肉生长抑制剂或激活素 A 或 GDF-11 的活性的能力。如本文中使用的, 术语“能够结合”肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11 是指通过本领域已知的方法测量的结合。例如, 可以使用基于 pMARE C2C12 细胞的试验来测量肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11 的体外抑制。通过小鼠模型中提高的瘦肌肉质量来证明体内活性。svActRIIB 多肽和蛋白的体内活性包括但不限于提高体重、提高瘦肌肉质量和提高瘦肌肉与脂肪质量的比。治疗活性进一步包括降低或防止由特定类型的肿瘤引起的恶病质、防止特定类型肿瘤的生长和提高特定动物模型的存活。以下提供 svActRIIB 蛋白和多肽活性的更多讨论。

[0433] 在另一个方面中, 本发明提供了包括编码本发明的 svActRIIB 多肽的多核苷酸的分离核酸分子。如本文中使用的, 术语“分离的”是指从内源性物质纯化至一定程度的核酸分子。

[0434] 在一个实施方案中, 多核苷酸编码具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的多肽, 除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换, 其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y, 和位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中, 多核苷酸编码具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 19 至 134 所示序列的多肽, 除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换, 其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y, 和位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中, 多核苷酸编码具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 23 至 134 所示序列的多肽, 除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换, 其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y, 和位置 44 处的置换是 T。在另一个实施方案中, 多核苷酸编码具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 25 至 134 所示序列的多肽,

除了位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,和位置 44 的置换是 T。在另一个实施方案中,多核苷酸编码具有与以上任一个多肽至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%相同的氨基酸序列的多肽,其中多肽具有位置 28 处的单氨基酸置换和位置 44 处的单氨基酸置换,其中位置 28 处的置换选自 W 或 Y,和位置 44 处的置换是 T,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。在一个实施方案中,以上实施方案的多核苷酸编码其中位置 28 处的置换是 W 和位置 44 处的置换是 T 的多肽。

[0435] 在一个实施方案中,本发明的分离的核酸分子包括编码具有 SEQ ID NO:4、6、12 和 14 中所示序列的多肽的多核苷酸。在另一个实施方案中,核酸包括编码与 SEQ ID NO:4、6、12 或 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的多肽的多核苷酸,其中多肽具有位置 28 处的 W 或 Y 和位置 44 处的 T,并且其中多肽能够结合激活素 A、GDF-11 或肌肉生长抑制剂。在一个实施方案中,以上实施方案的多核苷酸编码其中位置 28 处的置换是 W 和位置 44 处的置换是 T 的多肽,并且其中多肽能够结合激活素 A、GDF-11 或肌肉生长抑制剂。

[0436] 在另一个实施方案中,分离的核酸分子进一步包括编码至少一个异源蛋白质的多核苷酸。在一个实施方案中,异源蛋白质是 Fc 结构域,在进一步的实施方案中,Fc 结构域是人 IgG Fc 结构域。在另一个实施方案中,核酸分子进一步包括编码 SEQ ID NO:25、27、38、40、42、44、45、46、48、49 或 50 中所示的接头和铰链接头的多核苷酸。在进一步的实施方案中,这样的多核苷酸具有选自 SEQ ID NO:26、37、39、41 和 43 的序列。

[0437] 在一个实施方案中,核酸分子包括编码由 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 的组中所示序列组成的多肽的多核苷酸。在另一个实施方案中,核酸包括编码与 SEQ ID NO:8、10、16 和 18 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的多肽的多核苷酸,其中多肽具有位置 28 处的 W 或 Y 和位置 44 处的 T,并且其中多肽能够结合激活素 A、GDF-11 或肌肉生长抑制剂。在一个实施方案中,以上实施方案的多核苷酸编码其中位置 28 处的置换是 W 和位置 44 处的置换是 T 的多肽,并且其中多肽能够结合肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。

[0438] 在一个实施方案中,分离的核酸分子包括具有选自 SEQ ID NO:3、5、11 或 13 的序列的多核苷酸或其互补序列。在另一个实施方案中,分离的核酸分子包括具有选自 SEQ ID NO:7、9、15 和 17 的序列的多核苷酸或其互补序列。在进一步的实施方案中,分离的核酸分子在严格或中等条件下与 SEQ ID NO:3、5、7、9、11、13、15 或 17 杂交,其中编码的多肽与 SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16 或 18 基本上相似,其中多肽包括具有位置 28 处的 W 或 Y 和位置 44 处的 T 的氨基酸序列,并且编码的多肽能够结合或抑制激活素 A、肌肉生长抑制剂或 GDF-11。

[0439] 本发明的核酸分子包括单链和双链形式的 DNA,及其 RNA 互补序列。DNA 包括,例如,cDNA、基因组 DNA、合成 DNA、通过 PCR 扩增的 DNA 及其组合。可以通过常规技术,如通过使用 SEQ ID NO:3、5、11 或 13 的 DNA 或其合适的片段作为探针,来分离基因组 DNA。从可对于多个物种获得的基因组文库获得编码 ActRIIB 的基因组 DNA。可以从重叠的寡核苷酸片段的化学合成接着片段的装配来重建部分或全部编码区和侧翼序列而获得合成 DNA。可以从指导高水平 mRNA 合成的原核表达载体,如使用 T7 启动子和 RNA 聚合酶的载体,来获得

RNA。cDNA 获自从表达 ActRIIB 的各种组织分离的 mRNA 来制备的文库。本发明的 DNA 分子包括全长基因及其多核苷酸和片段。全长基因还可以包括编码 N- 端信号序列的序列。

[0440] 本发明进一步提供以上所述的核酸分子, 其中多核苷酸可操作地连接转录或翻译调控序列。

[0441] 示例性多核苷酸和多肽序列。

[0442] 不含信号序列的 svActRIIB

[0443] Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr (SEQ ID NO:2)

[0444] 具有信号序列的 svActRIIB(E28W, S44T)

[0445] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtgagacacggtggtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagcagga caagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctag atgacttcaactgctacgatagcagagtggtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgag ggcaacttctgcaacgagcgttcaactcatttgccagaggctgggggcccgaagtcacgtacgagccacccccgac agccccacc (SEQ ID NO:3)

[0446] 具有信号序列的 svActRIIB(E28W, S44T)

[0447] mefglswvflvallrgvqcetrcwiynanwelertnqtglercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvk kgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegnfnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO:4)

[0448] 不含信号序列的 svActRIIB(E28W, S44T)

[0449] gagacacggtggtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggag cgctgcaaggcgagcaggacaagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgt gaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgatagcagagtggtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgagggcaacttctgcaacgagcgttcaactcatttgccagaggctgggggcccgaagtc acgtacgagccacccccgacagccccacc (SEQ ID NO:5)

[0450] 不含信号序列的 svActRIIB(E28W, S44T)

[0451] etrcwiynanwelertnqtglercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvat eenpqvyfcccegnfnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO:6)

[0452] 具有信号序列的 svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 多核苷酸序列

[0453] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtgagacacggt ggtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagc aggacaagcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgct ggctagatgacttcaactgctacgatagcagagtggtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgct gctgtgagggcaacttctgcaacgagcgttcaactcatttgccagaggctgggggcccgaagtcacgtacgagc cccccgacagccccaccggagggggaggatctgtcgagtgccaccgtgccagcaccactgtggcaggac



cgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtgg  
 tggtggacgtgagccacgaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggacggcgagggtgcataatgcc  
 agacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggact  
 ggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctcca  
 aaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg  
 tcagcctgacctgcttggtaaaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg  
 agaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgg  
 acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgc  
 agaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:7)

[0454] 具有信号序列的 svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 多肽序列

[0455] mefglswvflvalrlrgvqcetrcwiyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvk  
 kgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegnfnerfthlpeaggpevtyeppptaptggggsvecppcpappva  
 gpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdw  
 lngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpenn  
 ykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO:8)

[0456] 不含信号序列的 svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 多核苷酸序列

[0457] gagacacggtggtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggag  
 cgctgcaaggcgagcaggacaagcggctgactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgt  
 gaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcactgaggagaacccccagg  
 tgtacttctgctgctgtgagggcaacttctgcaacgagcgttactcatttgccagaggctgggggccccggaagtc  
 acgtacgagccacccccgacagccccaccggagggggaggatctgtcagtgcccaccgtgcccagcaccacctgt  
 ggcaggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacgt  
 gcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggacggcgagggtgcataat  
 gccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccagga  
 ctggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctcca  
 aaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtc  
 agcctgacctgcttggtaaaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaa  
 caactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaaga  
 gcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagc  
 ctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:9)

[0458] 不含信号序列的 svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 多肽序列

[0459] etrcwiyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvat  
 eenpqvyfcccegnfnerfthlpeaggpevtyeppptaptggggsvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmsr  
 tpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapi  
 ektisktkgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsfflysk  
 ltvdkrsrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO:10)

[0460] 具有信号序列的 svActRIIB (E28Y, S44T)

[0461] atggagtttgggctgagctgggttttccctgcttcttttaagaggtgtccagtgtagacacggctac  
 tgcactactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagcagga

caagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggctgctggctag  
atgacttcaactgctacgatagggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgag  
ggcaacttctgcaacgagcgccttactcatttgccagaggctgggggcccgggaagtcacgtacgagccacccccgac  
agccccacc (SEQ ID NO:11)

[0462] 具有信号序列的 svActRIIB (E28Y, S44T)

[0463] mefglswvflvallrgvqcetryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvk  
kgcwlddfncyrqecvateenpqvyfcccenfcnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO:12)

[0464] 不含信号序列的 svActRIIB (E28Y, S44T)

[0465] gagacacggtactgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggag  
cgctgcaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgt  
gaagaaggctgctggctagatgacttcaactgctacgatagggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagg  
tgtacttctgctgctgtgagggcaacttctgcaacgagcgccttactcatttgccagaggctgggggcccgggaagtc  
acgtacgagccacccccgacagccccacc (SEQ ID NO:13)

[0466] 不含信号序列的 svActRIIB (E28Y, S44T)

[0467] etryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkcwlddfncyrqecvat  
eenpqvyfcccenfcnerfthlpeaggpevtyeppptapt (SEQ ID NO:14)

[0468] 具有信号序列的 svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 多核苷酸序列

[0469] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgccttttaagaggtgtccagtgtgagacacggt  
actgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgcctgcaaggcgagc  
aggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaaggctgct  
ggctagatgacttcaactgctacgatagggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgct  
gctgtgagggcaacttctgcaacgagcgccttactcatttgccagaggctgggggcccgggaagtcacgtacgagc  
acccccgacagccccaccggaggggaggatctgtcagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggac  
cgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtgg  
tggtggacgtgagccacgaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca  
agacaaagccacgggaggagcagttcaacagcaggtccggtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggact  
ggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctcca  
aaaccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg  
tcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg  
agaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagtcaccgtgg  
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgc  
agaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:15)

[0470] 具有信号序列的 svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 多肽序列

[0471] mefglswvflvallrgvqcetryciyyanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvk  
kgcwlddfncyrqecvateenpqvyfcccenfcnerfthlpeaggpevtyeppptaptggggsvecppcpappva  
gpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdw  
lngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpenn  
ykttppmlsdsgsflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg (SEQ ID NO:16)

[0472] 不含信号序列的 svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 多核苷酸序列



Asp Ile Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Gly Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys(SEQ  
 ID NO:23)

[0479] Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln  
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys(SEQ  
 ID NO:24)

[0480] 接头

[0481] Gly Gly Gly Gly Ser(SEQ ID NO:25)

[0482] 铰链接头

[0483] gga ggg gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca(SEQ ID NO:26)

[0484] 铰链接头

[0485] Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro(SEQ ID NO:27)

[0486] Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro(SEQ ID NO:28)

[0487] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro(SEQ ID  
 NO:29)

[0488] Glu Ser Lys Thr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro(SEQ ID NO:30)

[0489] Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp Pro  
 Gly(SEQ ID NO:31)

[0490] Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys Ala  
 Gly(SEQ ID NO:32)

[0491] 铰链接头

[0492] gga ggg gga gga tct gag cgc aaa tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc(SEQ ID

NO:37)

[0493] 铰接头

[0494] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys (SEQ ID NO:38)

[0495] 铰接头

[0496] gga ggg gga gga tct ggt gga ggt ggt tca ggt cca ccg tgc (SEQ ID NO:39)

[0497] 铰接头

[0498] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Cys (SEQ ID NO:40)

[0499] gga ggg gga gga tct ggt gga ggt ggt tca ggt cca ccg gga (SEQ ID NO:41)

[0500] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Gly (SEQ ID NO:42)

[0501] 铰接头

[0502] gga ggg gga gga tct gag cgc aaa tgt cca cct tgt gtc gag tgc cca ccg tgc (SEQ ID NO:43)

[0503] 铰接头

[0504] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Pro Pro Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys (SEQ ID NO:44)

[0505] 铰接头

[0506] Gly Pro Ala Ser Gly Gly Pro Ala Ser Gly Pro Pro Cys Pro (SEQ ID NO:45)

[0507] 铰接头

[0508] Gly Pro Ala Ser Gly Gly Pro Ala Ser Gly Cys Pro Pro Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro (SEQ ID NO:46)

[0509] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:47)

[0510] 铰接头

[0511] Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro (SEQ ID NO:48)

[0512] 铰接头

[0513] Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Gly Pro Pro Cys Pro (SEQ ID NO:49)

[0514] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Gly Pro Pro Cys Pro (SEQ ID NO:50)

[0515] 稳定化的激活素 IIB 型多肽结合激活肌肉 - 降解级联的配体。svActRIIB 多肽能够结合和抑制配体激活素 A、肌肉生长抑制剂和 / 或 GDF-11 的活性, 并且具有治疗涉及肌肉萎缩的疾病以及治疗特定癌症和其他疾病的能力。

[0516] 药物组合物和治疗方法

[0517] 治疗方法

[0518] 在一个方面中, 本发明提供了治疗受试者的方法。所述方法可以例如对受试者的健康具有总体有益的作用, 例如, 它可以增加受试者的预期寿命。或者, 所述方法可以例如治疗、预防、治愈、减轻或改善 (“治疗”) 疾病、失调、病症或病态 (“病症”)。根据本发明治疗的病症包括特征在于激活素 A 的不适当的表达或活性的病症。在一些这样的病症中, 表达或活性水平太高, 并且治疗包括施用如本文中所述的激活素 A 拮抗剂。如本文中使用的, 术语 “受试者” 是指任何动物, 如哺乳动物, 包括人。

[0519] 可以使用本发明的方法和组合物治疗的病症类型的一个实例是涉及细胞生长的病症, 例如, 伴随恶病质的癌性病症。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了用于治疗癌性病症的组合物和方法。特别地, 癌性病症是生殖腺癌, 包括卵巢和睾丸的肿瘤 (Fujii, Y. 等, *Am. J. Phys. Endocrin. Metab.*, 286:E927-E931, 2004; Reis, F. M. 等, *J. Clin. Endocrin.* 87:2277-2282, 2005)。激活素 A 在刺激垂体腺的 FSH 生物合成和分泌中的作用是已知的, 并且在生殖腺功能的调节中具有生理作用。激活素 A 与许多类型的人癌症相关并且特别与生殖系统的肿瘤相关。具体地, 激活素 A 的超表达或失调涉及卵巢癌 (Menon U 等, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*; 107(9):1069-74, 2000; Choi KC 等, *Molecular & Cellular Endocrinology*. 174(1-2):99-110, 2001; Zheng W 等, *American Journal of Reproductive Immunology*. 44(2):104-13, 2000; Lambert-Messerlian GM 等, *Gynecologic Oncology*. 74(1):93-7, 1999; Steller MD 等, *Molecular Cancer Research: MCR*. 3(1):50-61, 2005; Corbellis L 等, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 11(4):203-6, 2004; Welt CK 等, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 82(11):3720-7, 1997 和 Harada K. 等, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81(6):2125-30, 1996)、子宫内膜腺癌 (Otani, T 等, *Gynecologic Oncology*. 83(1):31-8, 2001; Tanaka T 等, *International Journal of Oncology*. 23(3):657-63, 2003) 和前列腺癌 (Thomas TZ 等, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 82(11):3851-8, 1997; Zhang, Z 等, *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 234(2):362-5, 1997 和 Risbridger GP 等, *Molecular & Cellular Endocrinology*. 180(1-2):149-53, 2001)。

[0520] 癌性病症可以是使用本文中包括的组合物可以治疗的任何癌性病症, 所述组合物例如抗激活素 A 化合物, 如激活素 IIB 受体多肽 (svActRIIB), 以及激活素 A 抗原结合蛋白如抗激活素 A 抗体、抗体片段或抗体衍生物。癌性病症的实例包括, 例如, 急性成淋巴细胞性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS 相关癌症、AIDS 相关淋巴瘤和癌症、儿童期小脑星形细胞瘤、儿童期大脑星形细胞瘤、基底细胞癌、肝外胆管癌、膀胱癌、骨肉瘤 / 恶性纤维性组织细胞瘤骨癌、脑肿瘤 (例如, 脑干胶质瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤 / 恶性神经胶

质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视通路和下丘脑神经胶质瘤)、乳腺癌、支气管腺瘤 / 类癌瘤、伯基特氏淋巴瘤、类癌肿瘤、胃肠类癌瘤、原发部位不明的癌、原发性中枢神经系统、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤 / 恶性神经胶质瘤、宫颈癌、儿童期癌症、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓增殖紊乱、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤 t- 细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤文氏家族肿瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼内黑素瘤眼癌、成视网膜细胞瘤眼癌、胆囊癌、胃的 ( 胃 ) 癌、胃肠道类癌肿瘤、生殖细胞肿瘤 ( 例如, 颅外、性腺外和卵巢 )、妊娠滋养细胞肿瘤、神经胶质瘤 ( 例如, 成人、儿童期脑干、儿童期大脑星形细胞瘤、儿童期视通路和下丘脑神经胶质瘤 )、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞 ( 肝 ) 癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视通路神经胶质瘤、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤 ( 内分泌腺 )、卡波济氏肉瘤、肾 ( 肾细胞 ) 癌、喉癌、白血病 ( 例如, 急性成淋巴细胞性、急性骨髓性、慢性成淋巴细胞性、慢性骨髓性和毛细胞性 )、唇和口腔癌、肝癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤 ( 例如, AIDS- 相关的、Burkitt' s、皮肤 t- 细胞、霍奇金、非霍奇金和原发性中枢神经系统 )、Waldenström's 巨球蛋白血症、骨的恶性纤维组织细胞瘤 / 骨肉瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、眼内 ( 眼 ) 黑素瘤、Merkel 细胞癌、间皮瘤、隐匿原发性的转移性鳞状颈癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤 / 浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓发育异常综合征、骨髓增生异常 / 骨髓增生性疾病、骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性失调、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口癌、口咽癌、骨肉瘤 / 骨的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜在肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、副鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、成松果体细胞瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤 / 多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞 ( 肾 ) 癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、软组织肉瘤、子宫肉瘤、Sezary 综合征、非 - 黑素瘤皮肤癌、merkel 细胞皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、皮肤 t- 细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、胃滋养细胞肿瘤、原发部位不明的癌瘤、原发部位不明的癌症、尿道癌、子宫内膜性子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、阴门癌、Waldenström's 巨球蛋白血症和 Wilm' s 肿瘤。

[0521] 本文中提供的特定方法包括将激活素 A 结合蛋白施用于受试者, 由此降低在特定病症中起作用的激活素 A 诱导的生物应答。在特定的实施方案中, 本发明的方法涉及将内源性激活素 A 接触激活素 A 结合蛋白, 例如, 通过施用于受试者或在离体程序中。

[0522] 术语“治疗”包括失调的至少一个症状或其他方面的减轻或预防, 或疾病严重程度降低等。此外, “治疗”进一步涉及施用本文中所述的治疗剂用于预防或减轻需要的受试者中失调的至少一个症状或其他方面。抗原结合蛋白不需要实现完全治愈, 或根除疾病的每个症状或表现来构成可行的治疗剂。如相关领域中公认的, 用作治疗剂的药物可以降低给定疾病状态的严重性, 而不需要消除疾病的每个表现才能被认为是有用的治疗剂。相似地, 为了构成可行的预防剂, 预防性施用的治疗不需要在防止疾病的发作中完全有效。只要减少疾病的影响 ( 例如, 通过降低其症状的数量或严重程度, 或通过提高另一种治疗的有效性, 或通过产生另一种有益作用 ) 或降低受试者中疾病将发生或恶化的可能性就足够了。本发明的一个实施方案涉及一种方法, 其包括将激活素 A 拮抗剂施用于患者, 所述施用的量和时间足以诱导优于反映出特定失调的严重程度的指示剂基线的持续改善。

[0523] 还考虑了抗原结合蛋白在离体程序中的用途。例如,可以将患者的血液或其他体液结合全长激活素 A、一种或多种激活素 A 异形体或其他部分长度的激活素 A 的蛋白离体地接触。抗原结合蛋白可以结合合适的不可溶性基质或固体支持物材料。

#### [0524] 鉴别用于治疗的受试者

[0525] 可以监测受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的水平以鉴别需要对于卵巢癌的治疗的受试者,包括浆液性卵巢癌(卵巢肿瘤,包括表面上皮-基质肿瘤)。例如,可以检测受试者的生物标志物 CA-125 和 / 或激活素 A 的水平,并与对照进行比较。首先,评价受试者的 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平。接着,将受试者的 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平与阴性对照样品或阳性对照样品中的表达水平进行比较。如果受试者的 CA-125 和 / 或激活素 A 的表达水平超过阴性对照样品中的表达水平,或如果表达水平符合或超过阳性对照样品中的表达水平,将受试者鉴别为需要卵巢癌治疗的受试者。在一些方面中,如果表达水平超过在早些时间获取的受试者的表达水平,特别是肿瘤处于早期阶段时,可以将受试者鉴别为需要卵巢癌治疗的受试者。已知技术可以用于测量例如受试者血清中的 CA-125 和 / 或激活素 A 水平。可以使用任何合适的技术,例如,ELISA 或 RT-PCR,测量血液样品中的 CA-125 和 / 或激活素 A 水平。

[0526] 可以监测受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的水平以鉴别需要卵巢癌治疗的受试者,包括透明细胞卵巢癌(由胚胎中肾引起的上皮卵巢肿瘤)、颗粒细胞卵巢癌(来自生殖索基质细胞的肿瘤)、莱迪希细胞肿瘤(源自莱迪希细胞的睾丸肿瘤)和生殖索基质睾丸肿瘤(源自睾丸和卵巢基质)。可以检测受试者中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 因子的水平并与对照进行比较。首先,评价受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 的表达水平。接着,将受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 的表达水平与阴性对照样品或阳性对照样品中的表达水平进行比较。如果受试者的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 的表达水平超过阴性对照样品中的表达水平,或如果表达水平符合或超过阳性对照样品中相应因子的表达水平,则将受试者鉴别为需要卵巢癌治疗的受试者。在一个实施方案中,如果受试者的激活素 A 水平是相同年龄的正常人的激活素 A 水平的三倍,或如果受试者的激活素 A 水平超过 3200pg/mL,则可以预测该特定的受试者应当开始接受治疗。已知技术可以用于测量例如受试者血清中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 水平。可以使用任何合适的技术,例如,ELISA,测量血液样品中的激活素 A、VEGF 和 / 或 Ang-1 水平。

[0527] 在一些实施方案中,受试者具有突变的激活素基因或突变的激活素反调节剂(counterregulator)基因(如抑制素)。在进一步的实施方案中,突变是抑制素或激活素蛋白的  $\beta$ -A- 亚基中的 Asn386Ser 突变(GenBank Accession Number:NM\_002192.2; MIM#147290;www.lov.d.nl/inhba)、抑制素或激活素蛋白的  $\alpha$  前结构域的 Arg60Leu 突变(GenBank Accession Number:NM\_002191.3;www.lov.d.nl/inha),或抑制素或激活素蛋白的  $\alpha$  前结构域的 Gly280Glu 突变(GenBank Accession Number:NM\_002192.2)(参见, Tournier 等, Hum. Mutat. 0 :1-4, 2013)。

#### [0528] 组合物

[0529] 还提供了含有本发明的蛋白质和多肽的药物组合物。这样的组合物在与药物学上可接受的材料和生理学上可接受的配制材料的混合物中包含治疗或预防有效量的多肽或蛋白质。药物组合物可以含有用于改变、维持或保持例如 pH、摩尔渗透压浓度、粘度、澄



清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、组合物的吸收或渗透的配制材料。

[0530] 合适的配制材料包括,但不限于,氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐、其他有机酸);膨胀剂(如甘露糖醇或甘氨酸)、螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));复合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 $\beta$ -环糊精或羟丙基- $\beta$ -环糊精);填充剂;单糖;双糖和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂;调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐反离子(如钠);防腐剂(如杀藻胺、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、洗必泰、山梨酸或过氧化氢);溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(如甘露糖醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(如pluronic、PEG、山梨聚糖酯、聚山梨醇酯,如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、曲通(triton)、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、四丁酚醛(tyloxapal));稳定性增强剂(蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(如碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露糖醇山梨糖醇);递送载体;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。中性缓冲盐水或与同种的血清白蛋白混合的盐水是合适稀释剂的实例。根据合适的工业标准,还可以添加入苜醇这样的防腐剂。可以使用合适的赋形剂溶液(例如,蔗糖)作为稀释剂将组合物配制成冻干产物。合适的组分在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的。可以用于药物配制中的组分的更多实例呈现于Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学),第16版,(1980)和第20版(2000),Mack Publishing Company, Easton, PA。

[0531] 任选地,组合物另外包含一种或多种生理活性剂,例如,第二激活素A受体抑制物质、抗-血管生成物质、化疗物质(如卡培他滨、5-氟尿嘧啶或阿霉素)、止痛物质等,本文中提供了其非穷举性实例。在各种特别的实施方案中,除了激活素A结合蛋白外,组合物包含一种、两种、三种、四种、五种或六种生理活性剂。

[0532] 在本发明的另一个实施方案中,本文中公开的组合物可以以中性或盐的形式来配制。说明性的药物学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基基团形成)并且其与无机酸(如,例如,盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基基团形成的盐也可以源自无机碱(如,例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有有机碱(如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。配制时,将以与剂型相容的方式并且以治疗有效的量来施用溶液。

[0533] 载体可以进一步包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。这样的用于药物活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。除非任何常规的介质或试剂与活性成分不相容,否则将考虑其在治疗组合物中的使用。还可以将补充活性成分并入组合物中。短语“药物学上可接受的”是指在施用于人不产生过敏或相似的不当反应的分子实体和组合物。

[0534] 最佳的药物组合物将由本领域技术人员根据例如打算的施用途径、递送形式和所需剂量来确定。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学),同上。这样的组合物可以影响多肽的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。例如,合适的组合物可以是注射用水、用于胃肠外施用的生理盐水溶液。

**[0535] 治疗的施用**

[0536] 制剂可以以多种方法来递送,例如,皮下、静脉内、腹膜内、口服或通过吸入疗法。这样的途径是本领域技术人员公知的,其中一些例如在美国专利 No. 5, 543, 158 ;美国专利 No. 5, 641, 515 和美国专利 No. 5, 399, 363 中有进一步的描述。在考虑胃肠外施用,用于本发明中的治疗组合物可以是在药物学上可接受的媒介中包含所需多肽的、无热原的、胃肠外可接受的水溶液的形式。用于胃肠外注射的特别合适的媒介是无菌蒸馏水,在其中多肽配制成无菌的、等渗溶液(适当保存的)。再另一种制剂可以涉及用提供产品的受控释放或持续释放的试剂如可注射的微球体、生物易蚀的颗粒、聚合化合物(聚乳酸、聚乙醇酸)、珠子或脂质体制配所需的分子,其随后可以通过积存注射来递送产品。还可以使用透明质酸,并且这可以具有促进循环中的持续时间的的作用。用于引入所需分子的其他合适方式包括可植入药物递送装置。

[0537] 在另一个方面中,适用于注射施用的药物制剂可以在水溶液中配制,优选在生理相容的缓冲液中配制,如 Hanks' 溶液、Ringer' s 溶液或生理缓冲盐水。水性注射悬浮液可以含有提高悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。另外,可以将活性化合物的悬浮液制成合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介包括脂肪油,如芝麻油,或合成的脂肪酸酯,如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。非脂质聚阳离子氨基聚合物也可以用于递送。任选地,悬浮液还可以含有合适的稳定剂或试剂来增强化合物的溶解性和允许制备高度浓缩的溶液。在另一个实施方案中,药物组合物可以配制用于吸入。吸入溶液也可以用于气溶胶递送的推进剂配制。在再另一个实施方案中,可以将溶液雾化。肺部施用进一步描述于 PCT 申请 No. PCT/US94/001875 中,其描述了化学修饰蛋白质的肺部传送。

[0538] 在一个实施方案中,对于水溶液的胃肠外施用,如果需要,溶液应当合适地缓冲,且首先用足量的盐水或葡萄糖使得液体稀释剂呈现为等渗的。这些特别的水溶液尤其适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。关于这一点,可以使用的无菌水性介质是本领域技术人员根据本发明的公开内容可获知的。例如,可以将一剂溶解于 1ml 等渗 NaCl 溶液中并且加入到 1000ml 皮下输液流体中或在建议的灌注部位注射(参见,例如,Remington' s Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学),第 15 版,pp. 1035-1038 和 1570-1580)。根据待治疗受试者的病症,必需进行剂量的一些变化。此外,对于人类施用,制剂当然优选满足 FDA 局的生物制剂标准的无菌性、致热原性以及一般安全性和纯度标准。

[0539] 还考虑了特定制剂可以口服施用。在本发明的一个实施方案中,以这种方式施用的分子可以用或不用固体剂型(如片剂或胶囊)的复合中常用的那些载体配制。例如,当生物利用度最大化和系统前降解最小化时,胶囊可以设计成在胃肠道的某个点释放制剂的活性部分。可以包括其他试剂来促进治疗性分子的吸收。还可以使用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂和粘合剂。用于口服施用的药物组合物还可以以适用于口服施用的剂量使用本领域公知的药物学上可接受的载体来配制。这样的载体能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、糖丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等用于患者服用。

[0540] 可以通过将活性化合物与固体赋形剂组合并加工所得到的颗粒混合物(任选地,研磨后)来获得片剂或糖丸核心而可以获得口服使用的药物制剂。如果需要,可以加入合适的助剂。合适的赋形剂包括碳水化合物或蛋白质填充剂,如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露糖

醇和山梨糖醇；来自玉米、小麦、水稻、马铃薯或其他植物的淀粉；纤维素，如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠；树胶，包括阿拉伯胶和黄芪胶；以及蛋白质，如明胶和胶原蛋白。如果需要，可以加入崩解剂或增溶剂，如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂和海藻酸或其盐，如海藻酸钠。

[0541] 糖丸核心可以结合合适的包衣一起使用，如浓缩糖溶液，其还可以含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡巴浦尔胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或色素加入片剂或糖丸包衣中用于产品识别或表征活性化合物的量，即剂量。

[0542] 可以口服使用的药物制剂还包括由明胶制得的推入配合胶囊，以及由明胶和包衣（如，甘油或山梨糖醇）制得的软密封胶囊。推入配合胶囊可以含有与填充剂或粘合剂（如乳糖或淀粉）、润滑剂（如滑石或硬脂酸镁）和任选地稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中，活性化合物可以溶解或悬浮于合适的液体中，如脂肪油、液体或液体聚乙二醇，含有或不含稳定剂。

[0543] 另外的药物组合物将是本领域技术人员显而易见的，包括在持续递送制剂或受控递送制剂中涉及多肽的制剂。用于配置多种其它的持续递送方式或受控递送方式的技术，如脂质体载体、生物可蚀微粒或多孔珠子和积存注射，也是本领域技术人员已知的。参见，例如，描述了用于药物组合物递送的多孔聚合物微粒的受控释放的 PCT/US93/00829。持续释放制剂的其他实例包括成型物体（例如，薄膜或微胶囊）形式的半透性聚合物基质。持续释放基质可以包括聚酯、水凝胶、聚交酯 (U. S. 3, 773, 919, EP 58, 481)、L- 谷氨酸和  $\gamma$  乙基-L- 谷氨酸盐的共聚物 (Sidman 等, Biopolymers, 22:547-556 (1983))、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯) (Langer 等, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981) ; Langer 等, Chem. Tech., 12:98-105 (1982))、乙烯乙酸乙烯酯 (Langer 等, 同上) 或聚-D(-)-3-羟基丁酸 (EP 133, 988)。持续释放组合物还包括脂质体，其可以通过本领域已知的几种方法中的任何一种来制得。参见，例如，Eppstein 等, PNAS (USA), 82:3688 (1985) ; EP 36, 676 ; EP 88, 046 ; EP 143, 949。

[0544] 在特定的实施方案中，脂质体、纳米胶囊、微粒、脂质颗粒、囊泡等用于将本发明的组合物引入合适的宿主细胞 / 生物体中。特别地，本发明的组合物可以配制成包裹在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球球、纳米颗粒等中用于递送。或者，本发明的组合物可以共价或非共价地结合这些载体媒介的表面。

[0545] 作为潜在药物载体的脂质体和脂质体-样制剂的配制和使用通常是本领域技术人员已知的（参见，例如，Lasic, Trends Biotechnol. 16(7):307-21, 1998 ; Takakura, Nippon Rinsho 56(3):691-95, 1998 ; Chandran 等, Indian J. Exp. Biol. 35(8):801-09, 1997 ; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3):233-61, 1995 ; 美国专利 No. 5, 567, 434 ; 美国专利 No. 5, 552, 157 ; 美国专利 No. 5, 565, 213 ; 美国专利 No. 5, 738, 868 和美国专利 No. 5, 795, 587, 各自具体地全部按引用并入本文中）。脂质体的使用似乎与全身递送后的自身免疫应答或不可接受的毒性无关。在特定的实施方案中，脂质体从分散于含水介质中的磷脂形成并且同时形成多片层同心双层囊泡（也称为多片层囊泡 (MLV)）。

[0546] 或者，在其他实施方案中，本发明提供了本发明组合物的药物学上可接受的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常可以以稳定且可再现的方式包裹化合物（参见，例如，

Quintanar-Guerrero 等, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24(12):1113-28, 1998)。为了避免由于胞内聚合过载引起的副作用, 可以使用能够在体内降解的聚合物来设计这样的超细颗粒(大约 0.1  $\mu\text{m}$  的大小)。例如, 可以通过 Couvreur 等, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 5(1):1-20, 1988; zur Muhlen 等, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45(2):149-55, 1998; Zambaux 等, *J. Controlled Release* 50(1-3):31-40, 1998 和美国专利 No. 5, 145, 684 所述的来制得这样的颗粒。

[0547] 用于体内施用的药物组合物通常必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜的过滤来实现。在将组合物冻干的情况中, 使用这样方法的灭菌可以在冻干和重建之前或之后进行。用于胃肠外施用的组合物可以以冻干形式或在溶液中储存。此外, 通常将胃肠外组合物置于具有无菌入口的容器中, 例如, 具有通过皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0548] 一旦药物组合物已经配制, 它可以作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或者脱水或冻干粉储存在无菌小瓶中。这样的制剂可以以即用的形式或需要在施用前重建的(例如, 冻干的)形式来储存。

[0549] 在特定的实施方案中, 本发明涉及用于生产单剂量施用单元的试剂盒。试剂盒可以各自含有具有干燥的蛋白质的第一容器和具有水性制剂的第二容器。在本发明的范围内还包括含有单室和多室预装注射器(例如, 液体注射器和 lyosyringe)的试剂盒。

[0550] 此外, 本发明的药物组合物可以与提供关于这类药物组合物使用的说明的包装材料一起放于容器内。通常, 这样的说明将包括描述试剂浓度的有形表述, 以及在特定的实施方案内, 重建药物组合物可能必需的赋形剂成分或稀释剂(例如, 水、盐水或 PBS)的相对量。

[0551] 本发明还提供了包括至少一种根据本发明的抗激活素 A 结合剂的诊断试剂盒。结合剂可以是抗体。此外, 这样的试剂盒可以任选包括以下的一种或多种:(1) 用于筛选、诊断、预后、治疗监测或这些应用的任意组合的一种或多种结合剂的使用说明;(2) 抗激活素 A 结合剂的标记结合伴侣;(3) 其上固定抗激活素 A 结合剂的固相(如试剂条);和(4) 表示批准用于筛选、诊断、预后或治疗使用或其任意组合的法规的标签或插页。如果没有提供结合剂的标记结合伴侣, 可以用一种或多种可检测标记物, 例如, 化学发光、酶、荧光或放射性部分, 来标记结合剂自身。

[0552] 治疗上使用的药物组合物的有效量将取决于例如治疗环境和对象。本领域技术人员将知道用于治疗的合适剂量水平因此部分地根据递送的分子、多肽将使用的适应症、施用途径以及患者的体型(体重、体表面或器官大小)和状况(年龄和一般健康)而改变。因此, 临床医生可以滴定剂量并改变施用途径来获得最佳治疗效果。根据上述因素, 典型的剂量范围可以为约 0.1mg/kg 至高达约 100mg/kg 或更高。多肽组合物可以优选注射或静脉内施用。长效药物组合物可以每三至四天、每周或每两周施用, 取决于特定制剂的半衰期和清除速率。给药的频率将取决于所用制剂中多肽的药代动力学参数。通常, 施用组合物直至达到获得所需效果的剂量。因此组合物可以作为单剂量或随着时间作为多剂量(相同或不同的浓度/剂量)来施用, 或作为连续输注来施用。可以常规地进行合适剂量的进一步优化。可以通过使用合适的剂量-反应数据来确定合适的剂量。

[0553] 施用的剂量和频率可以根据如施用途径、使用的特定蛋白质、待治疗疾病的性质

和严重程度、病症是急性或慢性的以及受试者的大小和一般状况这样的因素而改变。可以通过所属领域已知的程序,例如,在可以涉及剂量递增研究的临床试验中,来确定合适的剂量。

[0554] 本发明的多肽或蛋白质可以施用例如一次或超过一次,例如在一段时间内以规律的间隔施用。在特别的实施方案中,在至少一个月或更长的时间段内,例如,一个月、两个月或三个月或甚至无限期地施用蛋白质。对于治疗慢性病症,长期治疗通常最有效。然而,对于治疗急性病症,施用较短的时间段,例如,从一周至六周,可能就足够了。通常,施用蛋白质直至患者针对选定的一种或多种适应症呈现出高于基线的医学相关的改善水平。

[0555] 本发明的特别实施方案涉及将约 1ng 蛋白质 /kg 受试者体重 / 天 (“1ng/kg/ 天”) 至约 10mg/kg/ 天,更优选约 500ng/kg/ 天至约 5mg/kg/ 天和最优选约 5  $\mu$ g/kg/ 天至约 2mg/kg/ 天剂量的蛋白质施用于受试者。在其他实施方案中,将蛋白质施用于成人,每周一次、每周两次或每周三次或更多次,用于治疗激活素 A 介导的疾病、病症或失调,例如,本文中公开的医学失调。如果注射,每成人剂量的蛋白质有效量范围可以为 1-20mg/m<sup>2</sup>,并且优选为约 5-12mg/m<sup>2</sup>。或者,可以施用固定剂量;该量范围可以为 5-100mg/ 剂。固定剂量的一个范围为约 20-30mg/ 剂。在本发明的一个实施方案中,通过注射重复施用 25mg/ 剂的固定剂量。如果使用注射以外的其他施用途径,根据标准医学实践适当地调整剂量。治疗方案的一个实例涉及在至少三周的时间段内每周注射约 20-30mg 剂量蛋白质一至三次,尽管可能需要更长时间段的治疗来诱导所需的改善水平。对于儿科受试者(年龄 4-17 岁),一个示例性的合适方案涉及皮下注射 0.4mg/kg,至高达最大 25mg/ 蛋白质的剂量,每周施用两次或三次。

[0556] 本文中提供的方法的特定实施方案涉及皮下注射 0.5mg 至 10mg 蛋白质,优选 3 至 5mg,每周一次或两次。另一个实施方案涉及肺部施用(例如,通过喷雾器)3mg 或更多的蛋白质,每周一次。

[0557] 本文中提供的治疗方案的实例包括皮下注射 1.5 至 3mg 剂量的蛋白质,一周一次,用于治疗其中激活素 A 信号传导起作用的病症。本文中提供了这样的病症的实例并包括,例如,恶病质、癌症、类风湿性关节炎和其中体重、身体质量、身体脂肪损失,或不能维持体重、身体质量、身体脂肪起作用的所有病症。持续每周蛋白质施用直至获得所需结果,例如,受试者症状减退。治疗可以按照需要恢复,或可选地,可以施用维持剂量。

[0558] 本文中提供的治疗方案的其他实例包括皮下或静脉内施用 0.5、1、3、5、6、7、8、9、10、11、12、15 或 20 毫克本发明的激活素 A 剂 / 受试者千克身体质量 (mg/kg) 的剂量。所述剂量可以一次施用于受试者,或以特定间隔超过一次施用,例如,一天一次、一周三次、一周两次、一周一次、一个月三次、一个月两次、一个月一次、每两个月一次、每三个月一次、每六个月一次或一年一次。治疗的持续时间,以及剂量和 / 或治疗频率的任何变化,可以在治疗过程中改变或变化以满足受试者的特别需求。

[0559] 药物组合物的其他施用途径与已知方法一致,例如,口服,通过腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉内、眼内、动脉内、门静脉、病灶内途径、髓内、鞘内、心室内、经皮或腹膜内注射;以及鼻内、肠、局部、舌下、尿道、阴道或直肠方式,通过持续释放系统或通过植入装置。在需要的情况中,可以通过弹丸注射或通过输注连续地,或通过植入装置,来施用组合物。可选地或另外地,可以通过将其上已经吸收或包封了所需分子的膜、海绵或另一种合

适的材料植入来局部施用组合物。在使用植入装置的情况中,可以将装置植入任何合适的组织或器官中,并且所需分子的递送可以通过扩散、定时释放大丸剂或连续施用。

[0560] 在另一个实施方案中,将蛋白质施用于受试者,其量和持续时间足以诱导反映出待治疗失调严重程度的至少一种指标的改善,优选持续的改善。可以评估反映出受试者的病态、疾病或病症的程度的各种指标用于确定治疗的量和时间是否足够。这样的指标包括,例如,临床上公认的疾病严重程度、症状或所讨论失调的表现的指标。在一个实施方案中,如果患者在间隔两至四周的至少两个场合呈现出改善,则认为改善是持续的。改善的程度通常通过医生来确定,医生可以基于体征、症状、活检或其他测试结果来进行这种确定,并且医生也可以使用给予受试者的调查问卷,如对于给定疾病研发的生活质量调查问卷。

[0561] 可以在用蛋白质治疗之前、期间和 / 或之后,监测受试者的激活素 A 水平以检测其水平的变化(如果有的话)。对于一些失调,升高的激活素 A 水平的发生率可以根据如疾病的阶段或疾病的特定形式的因素而改变。已知技术可以用于测量激活素 A 水平,例如,受试者血清中的水平。可以使用任何合适的技术,例如,ELISA,来测量血液样品中的激活素 A 水平。在一个实施方案中,如果受试者中的激活素 A 水平是相同年龄的正常人员中激活素 A 水平的三倍,或如果受试者中的激活素 A 水平超过 3200pg/mL,则表示特定的受试者应当开始接受治疗。在进一步的实施方案中,可以监测激活素 A 水平以确定治疗是否应当继续。例如,如果受试者的激活素 A 水平在特定的治疗时间段后从基线水平下降,则表示该特定受试者得益于治疗并且应当继续接受治疗。

[0562] 在一些情况中,通过植入已经使用如本文中描述的那些方法遗传工程化来表达和分泌多肽的特定细胞来递送本发明的多肽。这样的细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自体同源的、异源的或异种的。任选地,细胞可以是永生化的。为了降低免疫应答的机会,可以将细胞包封以避免周围组织的浸润。包封材料通常是生物相容的、半渗透性的聚合物外壳或膜,其允许多肽产物释放,但防止细胞被患者的免疫系统或来自周围组织的其他有害因子破坏。

[0563] 还设想了体内基因治疗,其中将编码本发明多肽或本发明多肽的衍生物的核酸分子直接引入受试者中。例如,将编码本发明多肽的核酸序列在使用或不使用合适的递送载体如腺-相关病毒载体的情况下通过局部注射核酸构建体引入靶标细胞中。可选的病毒载体包括,但不限于,逆转录病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒和乳头瘤病毒载体。可以通过局部注射所需的核酸构建体或含有所需核酸序列的其他合适的递送载体、脂质体-介导的转移、直接注射(裸 DNA)或微粒轰击(基因枪)在体内实现病毒载体的物理转移。

#### [0564] 联合治疗

[0565] 本公开的组合物可以单独使用或结合其他治疗剂一起使用,以增强其治疗效果或降低潜在的副作用。本发明的方法和组合物的特定实施方案涉及使用抗原结合蛋白和一种或多种其他的激活素 A 拮抗剂,例如,本发明的两种或更多种抗原结合蛋白,或本发明的抗原结合蛋白和一种或多种其他激活素 A 拮抗剂。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白单独施用或结合其他可用于治疗患者罹患的病症的药剂一起施用。这样的药剂的实例包括蛋白质性或非蛋白质性药物。在共施用多种治疗剂时,可以按照相关本领域公认的相应地调整剂量。“共施用”和联合治疗不限于同时施用,而且还包括其中在涉及将至少一种其他治疗剂施用于患者的治疗过程中至少施用一次蛋白质的治疗方案。

[0566] 可以与蛋白质共施用的其他药剂的实例是根据待治疗的特定病症选择的其他蛋白质或治疗性多肽。或者,以上讨论的在治疗特定病症之一中有用的非蛋白质性药物可以与激活素 A 拮抗剂共施用。

[0567] 在一个实施方案中,例如,通过攻击肿瘤中的多个位点或分子靶标,联合治疗获得了协同或叠加效应。可以结合本发明使用的联合治疗的类型包括抑制或激活(在合适的情况中)靶细胞中单一疾病相关途径中的多个结节、多个途径和靶组织内(例如,肿瘤内)的多个细胞类型。例如,本发明的激活素 A 抑制剂可以与促进细胞凋亡或抑制血管生成的治疗结合。在另一个实施方案中,单独使用时不能引发治疗上所需效果的靶向剂可以用于例如敏化癌细胞或增加其他药剂的治疗效果。在另一个实施方案中,根据本发明的激活素 A 抑制剂结合细胞毒性药物或其他诱导细胞凋亡的靶向剂一起使用。在另一个实施方案中,激活素 A 抑制剂结合一种或多种抑制涉及细胞存活的不同靶标(例如,PKB、mTOR)、不同受体酪氨酸激酶(例如,ErbB1、ErbB2、c-Met、c-kit)或不同细胞类型(例如,KDR 抑制剂、c-fms)的药剂一起使用。在另一个实施方案中,将本发明的激活素 A 抑制剂加入用于特定病症的现有标准疗法中。在另一个实施方案中,联合治疗包括用激活素 A 抑制蛋白和抗癌治疗(如外科手术、超声、放疗、化疗或另一种抗癌剂的治疗)来治疗受试者。

[0568] 在联合治疗的方法包括将超过一种的治疗施用于受试者的情况中,应理解施用的顺序、时间、次数、浓度和体积只受医学要求和治疗限制的限制,即,可以例如同时、连续、交替或根据任何其他施用方案将两种治疗施用于受试者。可以结合本文中所述的激活素 A 拮抗剂一起施用的药剂的实例包括,但不限于,卡培他滨、5-氟尿嘧啶、阿霉素、紫杉酚(taxol)、泰索帝、CPT-11、嗜中性粒细胞强化剂、irinotecan、SN-38、吉西他滨、herstatin 或激活素 A-结合 herstatin 衍生物(例如美国专利申请 No.05/0272637 中所述的)、**AVASTIN®**(Genentech, South San Francisco, CA)、**HERCEPTIN®**(Genentech)、**RITUXAN®**(Genentech)、**ARIMIDEX®**(AstraZeneca, Wilmington, DE)、**IRESSA®**(AstraZeneca)、**BEXXAR®**(Corixa, Seattle, WA)、**ZEVALIN®**(Biogen Idec, Cambridge, MA)、**ERBITUX®**(Imclone Systems Inc., New York, NY)、**GEMZAR®**(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、**CAMPTOSAR®**(Pfizer, New York, NY)、**GLEEVEC®**(Novartis)、SU-11248(Pfizer)、BMS-354825(Bristol-Myers Squibb)、panitumumab(Abgenix, Fremont, CA/Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) 和 denosumab(Amgen Inc., Thousand Oaks, CA)。

[0569] 在一个实施方案中,将抗激活素 A 化合物和卡培他滨施用于受试者。卡培他滨或 **XELODAR®**(Roche)(其在体内转换成 5-氟尿嘧啶)可以以 1250mg/m<sup>2</sup> 口服施用于受试者,一周两次,持续两周,接着一周休息期。卡培他滨还可以以不同的剂量和时间表来施用。在另一个实施方案中,可以将抗激活素 A 化合物和阿霉素脂质复合物施用于受试者。阿霉素脂质复合物或 **DOXIL®**(Janssen Biotech, Inc.) 可以以 40mg/m<sup>2</sup> IV 施用于受试者,每四周一次。阿霉素脂质复合物还可以以不同剂量和时间表来施用。

[0570] 用于在各种治疗方案(包括例如,皮下、口服、胃肠外、静脉内、鼻内和肌内施用)

和制剂中使用本文中所述的特定组合物的合适给药和治疗方案的研发是本领域公知的,并且上文中有所描述。

#### [0571] 抗体治疗

[0572] 可以使用特异性结合完整激活素 A 的治疗性抗体,其中大致 C11-S33(第一环)和大致 C81-E111(第二环)区域中的序列保持天然激活素 A 的构象。

[0573] 如果寡肽或多肽具有与抗体 A1-A14 的至少一个 CDR 和 / 或与交叉阻断抗体 A1-A14 中至少一个与激活素 A 的结合和 / 或通过抗体 A1-A14 中至少一个交叉阻断与激活素 A 的结合的激活素 A 结合剂的 CDR ;和 / 或其中结合剂可以阻断激活素 A 与激活素 A 受体的结合的激活素 A 结合剂的 CDR 至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的氨基酸序列,则其在本发明的范围内。

[0574] 如果激活素 A 结合剂多肽和抗体具有与抗体 A1-A14 中至少一个的可变区至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的氨基酸序列,和交叉阻断抗体 A1-A14 中至少一个结合激活素 A 和 / 或通过抗体 A1-A14 中至少一个交叉阻断与激活素 A 的结合 ;和 / 或可以阻断激活素 A 对激活素 A 受体的抑制作用,则其在本发明的范围内。

[0575] 根据本发明的抗体对人激活素 A 可以具有低于或等于  $1 \times 10^7 M$ , 低于或等于  $1 \times 10^8 M$ , 低于或等于  $1 \times 10^9 M$ , 低于或等于  $1 \times 10^{10} M$ , 低于或等于  $1 \times 10^{11} M$ , 或低于或等于  $1 \times 10^{12} M$  的结合亲和力。

[0576] 可以使用常规技术,例如 Scatchard 等 (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660-672(1949)) 所述的那些,或通过表面等离子体共振 (SPR ;Biacore, Biosensor, Piscataway, NJ),由本领域普通技术人员来测定抗体或结合伴侣的亲合力,以及抗体抑制结合的程度。对于表面等离子体共振,将靶分子固定于固相上并暴露于沿着流动池运行的移动相中的配体。如果发生了配体与固定靶标的结合,则局部折射率改变,导致 SPR 角度的变化,其可以通过检测反射光的强度的变化来实时监测。可以分析 SPR 信号的变化率以产生结合反应的结合和离解阶段的表观速率常数。这些值的比例给出了表观平衡常数(亲和力)(参见,例如,Wolff 等, Cancer Res. 53:2560-65(1993))。

[0577] 根据本发明的抗体可以属于任何免疫球蛋白类别,例如, IgG、IgE、IgM、IgD 或 IgA。其可以从动物,例如,家禽(例如,鸡)和哺乳动物(其包括,但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子或其他啮齿动物、母牛、马、绵羊、山羊、骆驼、人或其他灵长类)获得或衍生。抗体可以是内化抗体。美国专利申请 No. 2004/0146888A1 概括地公开了抗体的生产。

[0578] 在以上所述的产生根据本发明的抗体的方法中(包括操纵特定 A1-A14CDR 至新的框架和 / 或恒定区中),可以利用合适的分析方法来选择所需的抗体(即,用于测定对激活素 A 的结合亲和性的试验 ;交叉阻断试验 ;基于 Biacore 的竞争结合试验 ;体内试验)。

#### [0579] svActRIIB 治疗

[0580] 本发明提供了用于在体内和在体外降低或中和肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11 的量或活性的方法和药物组合物。svActRIIB 多肽对肌肉生长抑制剂、激活素 A 和 GDF-11 具有高结合亲和力,并且能够降低和抑制肌肉生长抑制剂、激活素 A 和 GDF-11 中至少一种的生物活性。



[0581] 在一个方面中,本发明提供了通过将有效剂量的 svActRIIB 组合物施用于受试者来治疗需要这样治疗的受试者的肌肉生长抑制剂相关的和 / 或激活素 A 相关失调的方法和试剂。

[0582] 本发明的组合物可用于提高受试者的瘦肌肉质量。组合物还可以用于提高瘦肌肉质量与脂肪质量的比例,并且因此降低作为受试者体重百分比的脂肪质量。实施例 3 证明了本发明的 svActRIIB 多肽和蛋白质可以提高动物中的瘦肌肉质量。

[0583] 可以通过 svActRIIB 组合物治疗的失调包括但不限于各种形式的肌肉萎缩以及代谢失调,如糖尿病和相关失调,和骨退行性疾病如骨质疏松。

[0584] 肌肉萎缩失调还包括营养不良,如 Duchenne's 肌营养不良、进行性肌营养不良、Becker's 型肌营养不良、Dejerine-Landouzy 肌营养不良、Erb's 肌营养不良和婴儿神经轴索型肌营养不良。其他肌肉萎缩失调由慢性疾病或失调引起,如肌萎缩侧索硬化、慢性阻塞性肺病、癌症、AIDS、肾衰竭、器官萎缩、雄激素剥夺和类风湿性关节炎。

[0585] 肌肉生长抑制剂和 / 或激活素的过表达可能引起恶病质、严重的肌肉萎缩综合征。恶病质由癌症引起,也可能由于类风湿性关节炎、糖尿病性肾病、肾衰竭、化疗、由烧伤引起的损伤以及其他原因引起。在另一实例中,发现肌肉生长抑制剂 - 免疫反应性蛋白的血清和肌内浓度在呈现 AIDS- 相关肌肉萎缩的男性中升高并且与无脂肪质量负相关 (Gonzalez-Cadavid 等,PNAS USA 95:14938-14943 (1998))。还证明肌肉生长抑制剂水平响应于烧伤而提高,导致肌肉分解代谢作用 (Lang 等,FASEB J 15, 1807-1809 (2001))。其他导致肌肉萎缩的病症可能产生于由于残疾引起的不活动如轮椅的限制,由于中风、疾病、脊髓损伤、骨折或创伤引起的长期卧床休息,以及微重力环境 (太空飞行) 中的肌肉萎缩。例如,发现血浆肌肉生长抑制剂免疫反应性蛋白在长期卧床休息后升高 (Zachwieja 等,J Gravit Physiol. 6 (2):11 (1999))。还发现了在航天飞机飞行过程中暴露于微重力环境的大鼠的肌肉与没有暴露的大鼠的肌肉相比表达了提高量的肌肉生长抑制剂 (Lalani 等,J. Endocrin 167 (3):417-28 (2000))。

[0586] 此外,年龄相关的脂肪 - 肌肉比例的提高和年龄相关的肌肉萎缩看来似乎与肌肉生长抑制剂相关。例如,平均血清肌肉生长抑制剂 - 免疫反应性蛋白在青年 (19-35 岁)、中年 (36-75 岁) 和老年 (76-92 岁) 男性和女性组中随着年龄升高,而平均肌肉质量和无脂肪质量在这些组中随着年龄下降 (Yarasheski 等,J Nutr Aging 6 (5):343-8 (2002))。此外,现在已经发现了肌肉生长抑制剂在心肌中以低水平表达并且在梗塞后在心肌细胞中表达上调 (Sharma 等,J Cell Physiol. 180 (1):1-9 (1999))。因此,降低心肌中的肌肉生长抑制剂水平可以提高梗塞后心肌的恢复。

[0587] 肌肉生长抑制剂还显示出影响代谢失调,包括 2 型糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病、高血糖症和肥胖症。例如,已经证明肌肉生长抑制剂缺失改善两种小鼠模型的肥胖和糖尿病表型 (Yen 等,FASEB J. 8:479 (1994))。本发明的 svActRIIB 多肽适用于治疗这样的代谢失调。因此,施用本发明的组合物将改善合适的受试者中的糖尿病、肥胖症和高血糖病症。此外,含有 svActRIIB 多肽的组合物可以降低肥胖个体的食物摄入。

[0588] 施用本发明的稳定化的 ActRIIB 多肽可以提高骨强度和降低骨质疏松和其他退行性骨病。已经发现,例如,肌肉生长抑制剂缺陷型小鼠显示出小鼠肱骨提高的矿物质含量和密度及松质骨和皮层骨肌肉连接的区域处提高的矿物质含量,以及提高的肌肉质量

(Hamrick 等, *Calcif Tissue Int* 71(1):63-8(2002))。此外,本发明的 svActRIIB 组合物可以用于治疗如用于治疗例如前列腺的雄激素剥夺疗法的情况中的雄激素剥夺的作用。

[0589] 本发明还提供了通过将有效剂量的 svActRIIB 蛋白质施用于动物来提高食用动物中肌肉质量的方法和组合物。由于在所有测试的物种中成熟 C- 端肌肉生长抑制剂多肽相似或相同,预期 svActRIIB 多肽在用于任何农业上重要的物种(包括牛、鸡、火鸡和猪)中提高瘦肌肉质量和降低脂肪是有效的。

[0590] 本发明的 svActRIIB 多肽和组合物还拮抗激活素 A 的活性,如以下的体外试验中所示的。已知激活素 A 在特定类型的癌症中表达,特别是生殖腺肿瘤,如卵巢癌,并且引起严重的恶病质(Ciprano 等, *Endocrinol* 141(7):2319-27(2000), Shou 等, *Endocrinol* 138(11):5000-5(1997); Coerver 等, *Mol Endocrinol* 10(5):534-43(1996); Ito 等, *British J Cancer* 82(8):1415-20(2000), Lambert-Messerlian 等, *Gynecologic Oncology* 74:93-7(1999))。因此,本发明公开的组合物可以用于治疗与激活素 A 过表达以及肌肉生长抑制剂表达相关的病症,如由特定癌症导致的恶病质,以及特定生殖腺类型肿瘤的治疗。

[0591] 此外,本发明的 svActRIIB 多肽可用于在多种试验中检测和定量肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11。通常,将本发明的稳定化的 ActRIIB 多肽在各种试验中用作捕获剂来结合和固定肌肉生长抑制剂、激活素 A 或 GDF-11,与例如 Asai 编辑, *Methods in Cell Biology* (细胞生物学方法), 37, Antibodies in Cell Biology (细胞生物学中的抗体), Academic Press, Inc., New York(1993) 中描述的那些相似。多肽可以以一些方式标记或可以与第三分子反应,如经标记使得能够检测和定量肌肉生长抑制剂的抗体。例如,可以用可检测部分(如,生物素)修饰多肽或第三分子,所述可检测部分然后被第四分子(如酶标记的抗生物素蛋白链菌素或其他蛋白质)结合(Akerstrom, *J Immunol* 135:2589(1985); Chaubert, *Mod Pathol* 10:585(1997))。

#### [0592] 实施例

[0593] 以下是用于进行本发明的特定实施方案的实施例。提供所述实施例只是用于说明的目的,并且不是用来以任何方式限制本发明的范围。已经努力来确保关于所用数字的准确性(例如,量、温度等),但当然一些实验误差和偏差应当是允许的。

[0594] 除非另外指出,本发明的实施将使用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药物学的常规方法。这样的技术在文献中有全面解释。参见,例如, T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (蛋白质:结构和分子特性) (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 目前的增加); Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室手册) (第 2 版, 1989); *Methods In Enzymology* (酶学方法) (S. Colowick 和 N. Kaplan 编辑, Academic Press, Inc); Remington's *Pharmaceutical Sciences* (雷明顿药物科学), 第 18 版, (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey 和 Sundberg *Advanced Organic Chemistry* (高级有机化学), 第 13 版, (Plenum Press) Vols A 和 B(1992)。

#### [0595] 方法

#### [0596] 材料

[0597] 通过将对应于人激活素 2B 型受体的胞外结构域 (aa7-100) 的 cDNA 片段亚克隆至 IgG2Fc 融合分裂载体中来工程设计 sActRIIB(可溶性 ActRIIB-Fc) 表达构建体。将构建体转染至 CHO 细胞中并且使用 mAb Select SuRe 亲和柱 (GE) 接着 Fractogel 色谱 (EMD Chemicals) 从培养基纯化重组 sActRIIB。

[0598] 使用 XenoMouse 技术 (Amgen Inc) 产生激活素 A 抗体 (对抗激活素 A 的全人单克隆抗体)。使用哺乳动物表达系统 (Amgen Inc) 产生重组激活素 A。

[0599] 下表中显示了以下使用的 sActRIIB 肽和激活素 A 抗体的序列。

[0600] 表 9 :sActRIIB 序列

[0601]

	ActRIIB 肽	接头	IgG2 Fc 结构域	全长
sActRIIB	ETRWCIYYNAN WELERTNQ <u>S</u> GL ERCEGEQDKRL HCYASWRNSSG TIELVKKGCWL DDFNCYDRQEC VATEENPQVYF CCCEGNFCNER FTHLPEAGGPE VTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 19)	GGGG SVECP PCP (SEQ ID NO: 27)	APPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQD WLNKEYKCKV SNKGLPAIEKTI SKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP MLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCVMHE ALHNHYTQKSL LSPGK (SEQ ID	ETRWCIYYNANWELERTN Q <u>S</u> GLERCEGEQDKRLHCY ASWRNSSGTIELVKKGCW LDDFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNERFT HLPEAGGPEVTYEPPTAP TGGGGSVECP PCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNKEYKCKVSNK GLPAIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

[0602]

	ActRIIB 肽	接头	IgG2 Fc 结构域	全长
			NO: 22)	21)

[0603] 表 10 :激活素 A 轻链和重链可变结构域序列

[0604]

	轻链可变结构域	重链可变结构域
激活素 A 抗体	SYEVTQAPSVSVSPGQ TASITCSGDKLGDKYA CWYQQKPGQSPVLVI YQDSKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAM DEADYYCQAWDSSTA VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 275)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYGLSWVRQAP GQGLEWMGWIIIPYNGNTNSA QKLGGRVTMTTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCARDRDY GVNYDAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 278)

[0605] 表 11 :激活素 A 轻链和重链恒定结构域序列

[0606]

	轻链恒定结构域	重链恒定结构域
激活素 A 抗体	Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser (SEQ ID NO: 84)	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

[0607]

		<p>Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys                  Val Val Val Asp Val Ser His                  Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe                  Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val                  Glu Val His Asn Ala Lys Thr                  Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe                  Asn Ser Thr Phe Arg Val Val                  Ser Val Leu Thr Val Val His                  Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys                  Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser                  Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro                  Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr                  Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro                  Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro                  Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys                  Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys                  Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro                  Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp                  Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu                  Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro                  Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly                  Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys                  Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg                  Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe                  Ser Cys Ser Val Met His Glu                  Ala Leu His Asn His Tyr Thr                  Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser                  Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 214)</p>
--	--	--

[0608] 小鼠模型

[0609] 伦理委员会批准。所有小鼠实验经机构动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 的批准并根据 NIH 的实验动物护理和使用指南 (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 来进行。

[0610] Inh-KO 小鼠。将具有完全建立的卵巢或睾丸肿瘤的 12- 周大的雌性和 8- 周大的雄性 inh-KO 小鼠接受单次注射的 PBS 或 sActRIIB (30mg/kg, SC)。作为对照, 年龄匹配的野生型同窝小鼠接受了单次注射的 PBS。注射后 14 天, 通过尸检测定了卵巢和睾丸器官重量。

[0611] TOV-21G 异种移植。将  $5 \times 10^6$  个 TOV-21G 卵巢癌细胞皮下植入单个雌性无胸腺 nu/nu 小鼠 (Harlan) 中。当平均肿瘤体积达到大约  $150\text{mm}^3$  时, 在肿瘤植入后第 12 天开始处理。小鼠接受 PBS、sActRIIB (30mg/kg, SC, 1X/ 周) 或激活素 A 抗体 (30mg/kg, SC, 2X/ 周)。在单独的化疗组合实验中, 用 PBS、sActRIIB (10mg/kg, SC, 1X/ 周)、5-FU (50mg/kg,

IP, 3 个周期, 每个周期每天注射 4 次) 或以上相同剂量的 sActRIIB 和 5-FU 组合处理。

[0612] CHO 异种移植。将  $3 \times 10^6$  个天然 (naïve) 或激活素 A 转染的 CHO 细胞肌肉植入单个雌性 CD1 裸鼠 (Harlan) 的右四头肌中。小鼠在植入时接受了 PBS 或激活素 A 抗体 (20mg/kg, 1X/周, SC)。

[0613] OV-90 异种移植。将  $3 \times 10^6$  个用激活素 A 转染的卵巢癌细胞 SC 植入单个雌性 CD1 裸鼠 (CRL) 中。在平均肿瘤体积已经达到大约  $150\text{mm}^3$  时, 在肿瘤植入后第 11 天开始, 用 PBS 或 sActRIIB (20mg/kg, SC, 1X/周) 处理小鼠。

[0614] G361 和 5637 异种移植。将  $5 \times 10^6$  个 G361 黑素瘤细胞和 5637 膀胱癌细胞分别 SC 接种至单个无胸腺 nu/nu 小鼠 (Harlan Inc) 中。在肿瘤体积达到  $130\text{mm}^3$ - $150\text{mm}^3$  时, 5637 植入后 4 天和 G361 植入后 14 天开始处理。5637 植入小鼠接受了 PBS 或激活素 A 抗体 (10mg/kg, SC, 2X/周)。G361 植入小鼠接受了 PBS 或 sActRIIB (20mg/kg, SC, 1X/周)。

[0615] 肿瘤大小和重量

[0616] 对于所有异种移植实验, 通过使用电子卡尺纵向测量肿瘤大小。紧接第 1 次给药之前, 将带有肿瘤的小鼠随机化以确保肿瘤大小在不同组中的均匀分布。按照肿瘤长度 (mm)  $\times$  肿瘤宽度 (mm)  $\times$  肿瘤高度 (mm) 来计算肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ )。通过尸检测定肿瘤重量。

[0617] 细胞培养物

[0618] 将原代 BAEC 培养物 (Lanza) 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM (Invitrogen) 中, 在 5%  $\text{CO}_2$  中  $37^\circ\text{C}$  下生长。将 TOV-21G 细胞 (ATCC) 在 MCDB 105 培养基 (Sigma, M6395) 和含有 15% 胎牛血清的培养基 199 (Invitrogen) 的 1:1 混合物中培养。将 MRC-5 和 CCD-Lu 细胞 (ATCC) 在补充 10% FBS 的 MEM (Invitrogen) 中培养。将 U937 和 THP-1 细胞 (ATCC) 在含有 10% FBS 和 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基 (Invitrogen) 中生长。

[0619] 体外增殖试验

[0620] 按照制造商推荐的实验方案, 通过使用实时活细胞成像系统 (IncuCyte) 分析 TOV-21G 癌细胞的体外生长速率。

[0621] 实时 RT-PCR

[0622] 使用 Rneasy 小型 RNA 试剂盒 (QIAGEN), 从细胞培养物分离总 RNA。将 25ng 的总 RNA 使用 TaqMan one-Step RT-PCR Master Mix 试剂和 Prism 7900HT 检测系统 (Applied Biosystems) 进行一步定量 RT-PCR 分析。将 GAPDH 用于标准化基因表达水平。除了人  $\beta$  A 引物组外, 用于实时 PCR 分析的所有引物获自 Applied Biosystems。当前研究中使用的特定引物的目录号如下:

[0623] 牛引物: VEGF (Bt03213282)、Ang-1 (Bt03249559); 激活素 ( $\beta$  A) (Bt03259358)、GAPDH (Bt03210913); 人引物: VEGF (Hs00900054)、Ang-1 (Hs00375822)、GAPDH (Hs02758991)。使用的人  $\beta$  A 引物序列如下: 5'-GAA AAG GAG CAG TCG CAC AGA-3' (SEQ ID NO:291)、5'-C TTC TGG TGG GAG TAG CGG-3' (SEQ ID NO:292) 和 TaqMan 探针 ATG CTG CAG GCC CGG CAG TC (SEQ ID NO:293)。

[0624] Northern 印迹

[0625] 在 Trizol (Invitrogen) 中均质化后, 从单个组织样品分离总 RNA。将每组含有从单个动物分离的等量总 RNA 的  $10\ \mu\text{g}$  RNA 的集合接受 Northern 印迹分析。用于  $\beta$  A 和 Ang-2 的 northern 探针通过使用 RT-PCR (Phusion, Biolabs) 来产生。 $\beta$  A 引物组: 5'-CCC TTG

CTT TGG CTG AGA GGA - 3' (SEQ ID NO:294) 和 5'-TC ACA GGT CGT CGT AGG TCG - 3' (SEQ ID NO:295); Ang-2 引物组: 5'-TGT GCC GGG GAG AAG AG (SEQ ID NO:296) 和 5' - TAC AGT AGT GGG TTG AGG TTC - 3' (SEQ ID NO:297)。为了标准化表达, 用  $\beta$ -肌动蛋白重新探测 northern 印迹膜。

#### [0626] Western 印迹

[0627] 从含有蛋白酶抑制剂 (Roche) 混合物的 T-PER 组织蛋白提取试剂 (Pierce) 中的细胞培养物或组织制备蛋白质提取物。通过 NuPAGE4-12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen) 分离每组含有从单个动物分离的等量蛋白质提取物的 5  $\mu$ g 总蛋白的集合, 并转移至 PVDF。用抗总 Smad2、p-Smad2 或 E-钙粘蛋白 (1:1000; Cell Signaling)、内皮糖蛋白、骨桥蛋白 (1:500; R&D Systems)、IGFBP-1、IGFBP-2 (1:500; Abcam) 的一抗, 接着 HRP-缀合的二抗 (1:2000; Cell Signaling) 来探测膜。剥离膜, 并用抗  $\alpha$ -微管蛋白 (1:1000; Cell Signaling) 抗体重新探测。

#### [0628] 激活素 A ELISA

[0629] 所有血清样品在知情同意下收集来自卵巢癌患者和健康受试者和购自 Bioreclamation, Inc。将血清样品在缓冲液 (DY995, R&D Systems) 中稀释, 并用 4M 脲 (Sigma) 在 4°C 下预处理过夜以解离结合激活素 A 的任何蛋白质。然后将样品转移至用激活素 A 单克隆抗体预先涂覆的 96 孔平板。在室温下 2hr 孵育和洗涤步骤 (DPBS 中 0.05% Tween 20) 后, 在室温下 1hr 加入生物素标记的激活素 A 单克隆抗体。然后洗涤平板, 并用抗生物素蛋白链菌素-辣根过氧化物酶 (Amersham) 在室温下孵育 1h。洗涤步骤后, 在室温下 10 分钟将四甲基联苯胺 (KPL) 底物加入孔中。加入酸性停止溶液 (KPL), 并且通过 450nm 下的波长吸光度测量测定底物的酶转化程度。测量的吸光度与存在的激活素 A 浓度直接成比例。使用吸光度 vs 激活素 A 浓度的标准曲线来测定测试样品中激活素 A 的量。通过使用 ELISA 测量 inh-KO 小鼠中的血清激活素 A 水平。

#### [0630] VEGF 和 Ang-1 ELISA

[0631] 通过使用免疫分析试剂盒 (R&D Systems) 测量了 inh-KO 小鼠中的血清 VEGF 水平, 并且通过按照制造商推荐的实验方案使用购自 Invitrogen (VEGF) 和 R&D Systems (Ang-1) 的 ELISA 试剂盒定量细胞系培养基中的人 VEGF 和 Ang-1 水平。

#### [0632] 组织学和光学显微镜检查

[0633] 用锌-福尔马林固定来自 inh-KO 小鼠的睾丸和卵巢。将组织切片进行 H&E 染色, 且然后用尼康 Eclipse 90i 显微镜检查。

#### [0634] 免疫组织化学

[0635] 制备 4  $\mu$ m 厚的锌-福尔马林固定的石蜡肿瘤组织切片。通过在 Unmask 溶液 (Vector H-3300) 中微波 3min, 接着在室温下在 10  $\mu$ g/ml 蛋白酶 K 中孵育 20min, 在 dH<sub>2</sub>O 中的 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中孵育 10 分钟, 将切片进行抗原复原 (antigen retrieval)。将切片在 PBS 中的 0.1% Tween-20 中进一步孵育 3min 以渗透细胞膜, 并在山羊血清中孵育 30min 以阻断非特异性结合。然后用特异性一抗将切片在室温下孵育 3 小时, 接着在生物素化的或荧光标记的二抗中孵育。在 Vector SG 试剂盒 (SK-4700) 或 DAB 中显色底物并在 Vector Fast Red (H-3403) 或苏木精中进行核复染。使用装备有 DS-Ri1 相机的尼康 Eclipse 90i 显微镜分析免疫染色的组织切片并拍照。所用的一抗及其稀释如下: VEGF (BD

Pharmingen550549) 1:20 或 VEGF (Abcam ab46154) 1:100、活性半胱天冬酶-3 (Abcam ab32042) 1:50、Ang-1 (Abcam ab8451) 1:500、骨桥蛋白 (Abcam ab8448) 1:200、CD-31 (Abcam ab56299) 1:100、E-钙粘蛋白 (Abcam ab76319) 1:80。对于免疫荧光染色,加入 PBS 中 1:50 稀释的 FITC-缀合的二抗 (Invitrogen),并孵育 30min。用 Vectashield PE (Vector) 将细胞核复染。

#### [0636] TUNEL 试验

[0637] 按照制造商推荐的实验方案 (Promega, G3250) 使用 DeadEndFluorometric TUNEL Systems,通过测量肿瘤切片中片段化 DNA 的量分析了 TOV-21G 肿瘤中的细胞凋亡。通过尼康荧光显微镜观察荧光素-12-dUTP-标记的 DNA。

#### [0638] 统计学

[0639] 使用 Student's t-检验比较组织样品的组。通过重复测量 ANOVA 分析了纵向测量。认为 P 值 < 0.05 是显著的。

#### [0640] 实施例 1:激活素阻断引起抑制素缺陷型小鼠中晚期卵巢和睾丸肿瘤的衰退

#### [0641] inh-KO 小鼠中的激活素 A 测量

[0642] 在卵巢癌患者和健康对照中测量了血清激活素 A 水平。如图 1 中所示,在卵巢癌患者中循环激活素 A 水平显著较高。

[0643] 接着,为了理解激活素影响肿瘤生长的机理,分析了激活素阻断对抑制素- $\alpha$  KO 小鼠 (激活素失调、自发性肿瘤形成和癌症恶病质的模型) (在下文中称为 inh-KO 小鼠) 中完全建立的生殖腺肿瘤的进一步生长的作用。在生殖腺肿瘤已经发展至晚期后中断了激活素信号传导以更好地评价激活素-拮抗的治疗潜能。

[0644] inh-KO 小鼠中随年龄变化的肿瘤重量的测量表明了雌性中 12 周和雄性中 8 周时,卵巢和睾丸肿瘤已经完全建立。将单剂量的激活素 A 拮抗剂 sActRIIB 施用于 12 周大的雌性和 8 周大的雄性 inh-KO 小鼠,并检测所得到的激活素 A 水平的改变以及卵巢和睾丸肿瘤大小。如预期的,这些带有建立的生殖腺肿瘤的 inh-KO 小鼠中血清激活素 A 水平存在显著提高 (图 2A 和 2B)。然而,在施用后一天内,sActRIIB 将 inh-KO 小鼠中升高的激活素 A 降至野生型 (WT) 小鼠中看到的正常对照水平,并且这种激活素 A 中和作用在 14 天研究期间持续。出乎意料地,尸检分析揭示了通过 sActRIIB 处理中和激活素时,inh-KO 小鼠中非常大的卵巢肿瘤团块快速衰退至 WT 对照小鼠中看到的大小 (图 3A 和图 3B)。相似地,在用 sActRIIB 处理的雄性 inh-KO 小鼠中,睾丸肿瘤团块快速衰退至 WT 对照水平 (图 4A 和图 4B)。因此,sActRIIB 快速和完全根除了 inh-KO 小鼠中已经完全建立的卵巢和睾丸肿瘤块。

#### [0645] Northern 印迹分析

[0646] 接着,通过 Northern 印迹分析检验了肿瘤中的激活素 A ( $\beta$ A) mRNA 表达。肿瘤中的  $\beta$ A 转录产物的水平比 WT 对照中高得多,但这种提高被 sActRIIB 处理完全阻断 (图 5A)。这种发现表明肿瘤内新的正反馈环的存在,通过其激活素 A 上调了其自身表达 (参见下文)。激活素 A 诱导的 Smad2 信号传导在肿瘤中也显著提高,高于 WT 对照中的水平,如通过磷酸-Smad2 量的 Western 印迹试验所示的。此外,sActRIIB 处理消除了肿瘤组织中磷酸-Smad2 的这种提高 (图 5B)。因此,sActRIIB 防止了卵巢和睾丸肿瘤中的激活素 A mRNA 的上调和 Smad2 信号传导的激活。

#### [0647] Western 印迹分析



[0648] 为了验证卵巢肿瘤大小响应于 sActRIIB 处理的显著降低确实反映出肿瘤衰退, 使用 Western 印迹分析来检查肿瘤中 E- 钙粘蛋白的表达, E- 钙粘蛋白是维持卵巢正常分化中关键的细胞粘附蛋白。显著地, 在来自未处理的 inh-KO 小鼠的卵巢肿瘤中没有检测到 E- 钙粘蛋白, 但单次注射 sActRIIB 显著恢复了损失的 E- 钙粘蛋白 (图 6A)。通过免疫染色确认了这些观察。尽管在未处理的 inh-KO 小鼠的卵巢癌切片中没有检测到 E- 钙粘蛋白的免疫反应性, 但用 sActRIIB 处理导致卵巢切片中明显不同的 E- 钙粘蛋白免疫反应性的重新出现 (图 6B)。因此, 提高的激活素信号传导下调了卵巢中的 E- 钙粘蛋白。这种下调的逆转是值得注意的, 因为 E- 钙粘蛋白的丢失涉及卵巢癌进展。

#### [0649] 光学显微镜分析

[0650] 通过光学显微镜检查卵巢和睾丸肿瘤中的形态学变化。在未处理的 inh-KO 小鼠中, 大大扩增的卵巢主要充满了实体肿瘤块和许多出血性病灶, 实际上没有剩余可识别的卵泡。相反, 在 sActRIIB 处理的雌性 inh-KO 小鼠中, 卵巢大小正常并且含有许多可识别的滤泡、最小的肿瘤细胞侵入和很少出血性病灶 (图 7A)。在未处理的雄性 inh-KO 小鼠中, 睾丸中的正常结构被大块的、未分化的实体肿瘤块替代, 并且没有明显生精小管。相反, 在 sActRIIB 处理的雄性 inh-KO 小鼠中, 睾丸大小正常并且充满生精小管, 尽管精原细胞的数量低于正常和少许小区域仍然含有肿瘤细胞 (图 7B)。这些组织学发现意味着 sActRIIB 处理不仅引起生殖腺肿瘤的衰退, 而且促进正常组织分化。因此, sActRIIB 处理时肿瘤的收缩 (图 3A、图 3B、图 4A 和图 4B) 不只是团块的退化, 而且表示分化表型的逆转。

#### [0651] 实施例 2: 激活素阻断消除了生殖腺肿瘤中血管生成因子诱导和引起半胱天冬酶 -3 激活

[0652] 激活素中和时看到的显著肿瘤抑制很可能使得肿瘤衍生的激活素 A 通过诱导已知的肿瘤发生相关因子刺激肿瘤进展。为了测试这种可能性, 分析了在血管生成和肿瘤发生中起着非常确定的作用的血管生成因子 VEGF 和血管生成素。ELISA 揭示了带有晚期卵巢和睾丸肿瘤的 inh-KO 小鼠在其循环中具有大大提高的 VEGF 水平。单剂量的 sActRIIB 快速地将升高的 VEGF 降至 WT 对照水平 (图 8A)。此外, VEGF 和 Ang-1 免疫反应性在卵巢和睾丸肿瘤的切片中显著提高; 然而, sActRIIB 处理完全消除了肿瘤中的 VEGF 和 Ang-1 诱导 (图 8B, 分别为上图和下图)。此外, Northern 印迹分析揭示了 Ang-2mRNA 在卵巢和睾丸肿瘤中以高水平表达, 而 sActRIIB 处理抑制其过表达 (图 8C)。此外, Western 印迹分析揭示了已知涉及卵巢肿瘤血管生成和生长的几个其他因子, 包括内皮糖蛋白、骨桥蛋白、IGFBP-1 和 IGFBP-2, 在卵巢肿瘤中显著上调, 但通过 sActRIIB 施用完全消除了这些肿瘤发生相关蛋白的诱导 (图 8D)。

[0653] 接着, 使用了免疫染色来分析肿瘤组织切片中凋亡酶半胱天冬酶 -3 的活性。在来自未处理的 inh-KO 小鼠的卵巢或睾丸肿瘤切片中没有检测到活性半胱天冬酶 -3; 然而, 在 sActRIIB 处理的 inh-KO 小鼠中, 在其中残余的肿瘤细胞成簇的区域中的卵巢和睾丸组织切片中发现了活性半胱天冬酶 -3 的强染色 (图 9), 表明肿瘤凋亡的激活。这些结果表明肿瘤中升高的激活素 A 驱动了多个肿瘤血管生成 - 和肿瘤发生 - 相关因子的过量产生, 并且因此阻断肿瘤衍生的激活素 A 引起这些因子的剥夺, 其随之诱导肿瘤细胞中半胱天冬酶 -3 激活和细胞凋亡, 导致肿瘤抑制。

#### [0654] 实施例 3: 激活素拮抗剂通过与化疗的加和效应抑制人卵巢癌异种移植物的体内

## 生长

[0655] 为了进一步确定激活素拮抗是否可以抑制分泌激活素 A 的肿瘤的生长,分析了裸鼠中多个异种移植肿瘤的体内生长。分析主要集中于 TOV-21G 异种植物(人上皮卵巢癌模型)的体内生长,因为在培养物中,这些癌细胞分泌大量的激活素 A。在裸鼠中皮下植入 TOV-21G 导致血清激活素 A 急剧升高(图 10A)。在肿瘤建立后,我们将 sActRIIB 或激活素 A 抗体施用于 TOV-21G 植入小鼠。两种激活素 A 拮抗剂都显著抑制了 TOV-21G 卵巢癌异种植物的生长(图 10B)。

[0656] 为了进一步评价升高的激活素 A 对卵巢肿瘤生长的功能相关性,分析了两个另外的卵巢肿瘤异种植物,包括中国仓鼠卵巢(CHO)和人卵巢癌 OV-90 异种植物。植入四头肌后,天然 CHO 细胞不能形成可检测的肿瘤。然而,当用激活素 A 转染 CHO 细胞时,它们变得在裸鼠中非常可能形成肿瘤。此外,激活素-拮抗剂处理很大程度上降低了激活素 A 转染的 CHO 细胞的肿瘤形成速率(图 11)。此外,激活素阻断显著抑制了裸鼠中激活素 A 过表达 OV-90 异种植物的生长(图 12)。这些观察提供了升高的激活素 A 是肿瘤生长的重要刺激物的其他证据。

[0657] 这些发现表明了激活素拮抗可能是卵巢癌治疗中有价值的疗法。检验了 sActRIIB 对接受了 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗的 TOV-21G 异种植物生长的作用。在将 sActRIIB 处理或 5-FU 单独施用于带有 TOV-21G 异种植物的小鼠时,各自显著降低了肿瘤生长的速率(图 13),但在将 sActRIIB 和 5-FU 一起注射时,观察到了甚至更高的对肿瘤生长抑制的作用(图 13)。因此,sActRIIB 和 5-FU 明确地显示出对肿瘤抑制的加和作用。

[0658] 在另一个实验中,无胸腺裸鼠在腹侧接受 TOV-21G 异种植物。14 天后,每周皮下施用 hu-sActRIIB-Fc,单独或结合 5-FU 施用。

[0659] 肿瘤细胞注射后 52 天,使用 ANOVA 检验 hu-sActRIIB-Fc 治疗相对于媒介治疗的带有肿瘤的组获得了 43% ( $p < 0.0001$ ) 的肿瘤生长降低。5-FU 单一疗法获得了 47% ( $p < 0.0001$ ) 肿瘤生长降低,并且 hu-sActRIIB-Fc 和 5-FU 的组合一起获得了 73% ( $p < 0.0001$ ) 肿瘤生长降低。在这个实验的过程中,接受 hu-sActRIIB-Fc 的小鼠的体重增加了 26%,而接受 hu-sActRIIB-Fc 和 5-FU 的小鼠的体重增加了 22%,而接受媒介的对照带肿瘤小鼠呈现出 10% 体重减轻。

[0660] 接着,检查了激活素 A 拮抗剂对细胞培养物中 TOV-21G 生长的作用。令人惊讶地,发现提高 sActRIIB 或激活素 A 抗体的浓度对 TOV-21G 细胞体外增殖没有直接作用(图 14)。因此,TOV-21G 异种植物小鼠中激活素拮抗剂的肿瘤抑制作用在体内必然通过间接机理获得。

### [0661] 实施例 4:阻断激活素 A 防止人卵巢癌异种植物中血管生成并诱导凋亡

[0662] 因为激活素 A 诱导了 inh-KO 小鼠的肿瘤中几种血管生成因子的过表达,因此分析激活素 A 阻断在体内对 TOV-21G 肿瘤异种植物中血管生成的影响。TOV-21G 肿瘤切片的检查揭示了未处理切片中 VEGF 和 Ang-1 的强免疫染色,但在 sActRIIB 处理的切片中实际上没有(图 15A)。对于肿瘤切片中骨桥蛋白的免疫染色发现了相似的结果(图 15A),骨桥蛋白是涉及肿瘤血管生成和癌症进展的分泌蛋白。CD31(新形成的微血管的标志物)的免疫染色进一步证明了未处理的肿瘤切片中新微血管的存在并且在 sActRIIB 处理的肿瘤的切片中缺乏这样的新微血管(图 15B)。这些结果表明 sActRIIB 处理抑制了多种血管生成

因子并且防止 TOV-21G 肿瘤中的新血管生成。为了评价这种血管生成剥夺对肿瘤凋亡的可能影响,对肿瘤切片进行了活性半胱天冬酶 -3 免疫染色和 TUNEL 试验。如图 15C 中所示, sActRIIB 处理导致处理的肿瘤中活性半胱天冬酶 -3 和 DNA 片段化的明显提高。因此,与 inh-KO 小鼠中生殖腺肿瘤上的那些相一致,来自 TOV-21G 卵巢癌异种移植物的这些发现进一步证明了激活素 A 在肿瘤血管生成和生长中的主要作用。

#### [0663] 实施例 5:激活素 A 刺激癌和基质细胞中血管生成因子的过量产生

[0664] 除了癌细胞,肿瘤微环境含有邻近的基质、内皮和浸润免疫细胞。存在更多的证据表明:肿瘤中癌和非癌细胞之间复杂的相互影响在决定肿瘤恶性状态和进展中是关键。为了了解激活素 A 调节肿瘤生长的细胞机理,在肿瘤中发现的四种不同细胞类型 - 癌细胞、成纤维细胞、内皮细胞和单核细胞中检验了激活素 A 对血管生成因子表达的作用。具体地,用重组激活素 A 各自处理 TOV-21G 癌细胞、BAEC 内皮细胞、MRC-5 或 CCD-Lu 成纤维细胞和 U937 单核细胞的培养物,并通过实时 PCR 分析 VEGF 和 Ang-1 的表达。激活素 A 处理引起所有这些培养物中 VEGF 转录产物水平的显著提高(图 16A),以及 BAEC、MRC-5 和 CCD-Lu 培养物中 Ang-1 mRNA 水平的显著提高(图 16B)。因此,激活素拮抗剂 sActRIIB 防止了重组激活素 A 对 VEGF 和 Ang-1 的这种诱导(图 16A 和 16B)。此外,ELISA 揭示了激活素 A 处理提高了 TOV21G、MRC-5、CCD-Lu 和 TPH-1 细胞的 VEGF(图 17A) 以及 MRC-5 和 CCD-Lu 细胞的 Ang-1(图 17B) 释放至培养基中,而 sActRIIB 完全阻断了激活素 A 诱导的血管生成因子的这种释放(图 17A 和图 17B)。因此,激活素 A 能够上调存在于肿瘤微环境中的各种细胞类型的血管生成因子的转录和分泌。此外,检验了暴露于激活素 A 的作用,特别是确定暴露是否可能诱导这些细胞系中激活素 A ( $\beta$  A) mRNA 的内源性表达。值得注意的是,将重组激活素 A 加入 TOV21G、BAEC、MRC-5、CCD-Lu、U937 和 THP-1 培养物中显著上调了所有这些细胞中的  $\beta$  A 表达(图 18),并且这种诱导可以通过 sActRIIB 完全阻断。因此,激活素 A 产生可以扩增其自身在癌细胞以及在内皮细胞、成纤维细胞和单核细胞中的表达。这些发现证明了新的正反馈血管生成机制,其中癌细胞衍生的激活素 A 通过自分泌和旁分泌作用引发了多个细胞类型中愈加增高的激活素 A 过表达,导致肿瘤微环境中增强的 VEGF 和 Ang-1 的产生。

#### [0665] 实施例 6:激活素阻断抑制了人黑素瘤和膀胱癌异种移植物的生长

[0666] 为了了解激活素 A 是否还可以导致非卵巢癌的发病机理,检验了两种其他癌症类型(G361 人黑素瘤和 5637 人膀胱癌)的体内生长,因为它们在体外培养时显示出释放激活素 A。裸鼠植入 G361 和 5637 异种移植物,并且在肿瘤建立后,用 sActRIIB 或激活素 A 抗体处理经植入的小鼠。如图 19 中所示,激活素 A 阻断显著降低了这些非卵巢异种植入物的生长速率和大小。这种抑制提高了激活素 A 可以影响各种恶性肿瘤进展的可能性。

#### [0667] 实施例 7:激活素 A 转录产物在许多人癌症中高度升高

[0668] 对于多种癌症中升高的激活素 A 存在增多的证据。为了进一步验证人癌症中的激活素 A 过表达,使用 Oncomine 微阵列数据库来查询激活素 A ( $\beta$  A) 表达水平。如图 20 中所示,在检验的广泛人癌症类型中,包括乳腺癌、胃癌、胰腺癌、结肠直肠癌和头颈癌,与各自的对照组织相比,癌组织中的  $\beta$  A 转录产物水平升高。

[0669] 实施例 8:sActRIIB 撤除和 sActRIIB 重新施用对雌性抑制素- $\alpha$  敲除小鼠中卵巢肿瘤生长和恶病质的影响

[0670] 这个研究的目的是为了检验 sActRIIB 撤除重新施用对带有建立的卵巢肿瘤的

Inh  $\alpha$  KO (抑制素 -  $\alpha$  - 缺陷型敲除) 小鼠的体重、肿瘤质量和存活的长期药理学作用。从 Dr. Martin M. Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston, TX) 获得 Inh  $\alpha$  KO 小鼠 (Matzuk 等, 1992) 的许可。以混合的 C57BL6/129S6/SvEv 遗传背景来维持小鼠, 并且群体在 Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA) 繁殖。使用基因组尾 DNA 通过 PCR 进行了 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的基因型测定, 并由 Genetically Engineered Models and Services (Charles River Laboratories, Inc. Wilmington, MA) 来进行。

[0671] 具有 19.41 至 26.82 克体重的十一至十四周大的雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠皮下 (SC) 注射了 30mg/kg sActRIIB 或 PBS。年龄匹配的 WT 同窝对照小鼠注射了 PBS 并用作基线对照。在注射后 2 周以尸检结束研究。在研究中使用了两个小鼠群组。具有体重 17.7 至 27.4 克的十一至十三周大的雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠 SC 注射了 30mg/kg sActRIIB 或 PBS。年龄匹配的 WT 同窝对照小鼠注射了 PBS 并用作基线对照。撤除持续 8 周。在撤除结束时, 将 sActRIIB 处理的小鼠通过平衡体重分成两组 (组 3 和组 4)。

[0672] 将组 2 和组 3 安乐死来检查卵巢肿瘤。组 4 接受了另一个剂量的 30mg/kg sActRIIB, 并且在 4 周后 (总共 12 周) 与 WT 小鼠一起安乐死。每周一次记录小鼠体重, 直至 12 周。为了尸检, 将小鼠在 CO<sub>2</sub> 室中安乐死。收集 WT 小鼠中的正常卵巢和 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的卵巢肿瘤并称重。所有结果表示为平均值  $\pm$  平均值标准误差 (SEM)。使用 MS Excel 5.0 软件上的 Student's 2-尾 t-检验分析了组之间差异的统计学显著性。使用 Chi-Square 检验 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) 来检验动物存活时间的差异。通过  $p < 0.05$  值来表示组之间的统计学显著性。

[0673] 表 12 :sActRIIB 单次给药, 持续两周, 研究时间表

[0674]

组 No.	处理	n	途径	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	体积 (mL)	给药时间表
1 (WT)	PBS	8	SC	-	0	0.1	单剂量 第 0 周
2 (Inh $\alpha$ KO)	PBS	8	SC	-	0	0.1	单剂量 第 0 周
3 (Inh $\alpha$ KO-wk2)	sActRIIB	8	SC	30	9	0.1	单剂量 第 0 周

[0675] 表 13 :sActRIIB 撤除和重新给药时间表

[0676]

组 No.	处理	n	途径	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	体积 (mL)	给药时间表
1 (WT)	PBS	11	SC	-	0	0.1	单剂量 第 0 周和第 8 周
2 (Inh $\alpha$ KO)	PBS	8	SC	-	0	0.1	单剂量 第 0 周
3 (Inh $\alpha$ KO-wk8)	sActRIIB	7	SC	30	9	0.1	单剂量 第 0 周
4 (Inh $\alpha$ KO-wk12)	sActRIIB	11	SC	30	9	0.1	单剂量 第 0 周和第 8 周

[0677] 在头 4 周期间,单剂量的 sActRIIB(30mg/kg, SC) 在 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中获得了超过 WT 同窝对照水平的持续体重增加。此后和直至初始剂量后 8 周,sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的体重与 WT 对照相似,而 PBS 处理的 KO 小鼠的平均体重在整个研究期间明显低于 WT 对照。在第 8 周时,十一只 sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠给予另一单剂量的 sActRIIB。sActRIIB 的重新施用刺激了继续的 4- 周期间 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中进一步的体重增加(最多 12 周)(图 21)。

[0678] 用 PBS 治疗的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠产生了卵巢肿瘤并且在大约 15 周大小时呈现出急剧的肌肉和器官萎缩。小鼠中出现致命情况时,通过 CO<sub>2</sub>吸入将其安乐死。一只 WT 小鼠发现在笼中死亡(DIC),关于死因没有明确的解释。还存在一只在初始剂量后第 7 周时发现 DIC 的 sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠。在单剂量 sActRIIB 后 8- 周期间,分析了 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的存活率。在第 8 周时,与 PBS 处理的 Inh  $\alpha$  KO 组中的 12.5% (1/8 存活) 相比,sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的存活率为 94% (18 只中存活 17 只)(图 22)。

[0679] 单剂量 sActRIIB 后两周,KO 小鼠的平均肿瘤重量降至 WT 对照水平。在相同时间段中,PBS 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠产生了大的卵巢肿瘤(图 23)。初始单剂量撤除后 8 周时,sActRIIB 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的卵巢肿瘤重量已经生长至与 PBS 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠相似的大小,表明在化合物撤除期间卵巢肿瘤的重新生长。在第 8 周时,将 sActRIIB 的重新施用给予 11 只撤药的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠。在第 12 周(重新施用后 4 周)时分析的卵巢肿瘤块的数据表明 8 周撤药后 sActRIIB 的重新施用有效地缩小了肿瘤块(图 24)。

[0680] 本研究证明了 sActRIIB 在逆转雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的癌症恶病质和抑制卵巢肿瘤生长中是有效的。单剂量的 sActRIIB 对 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的体重增长具有长效作用。数据表明 sActRIIB 处理显著抑制了 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的卵巢肿瘤生长。Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的卵巢肿瘤块在用 sActRIIB 单剂量处理后 2 周后衰退至 WT 水平。初始剂量的 sActRIIB 撤药 8 周后,Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的卵巢肿瘤的重量与 PBS 处理组中看到的几乎相同。然而,sActRIIB 的重新施用将卵巢肿瘤块有效地退化至 WT 对照组的大小。这些数据表明在 8 周的延长时期给予的 sActRIIB 的间歇性施用在防止雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的体重减轻、抑制卵巢肿瘤生长和延长存活中是非常有效的。

[0681] 实施例 9 :sActRIIB 结合阿霉素对 TOV-21G 卵巢癌植入的雌性裸鼠中肿瘤生长、体重和肌肉质量的作用

[0682] 本研究的目的是检验药理学施用的 sActRIIB、阿霉素 (dox) 和 sActRIIB 加阿霉素分别对植入了 TOV-21G 卵巢异种移植肿瘤的裸鼠的体重、肿瘤生长和肌肉质量的作用。八周大的雌性无胸腺裸鼠 SC 注射 0.2mL 的  $5 \times 10^6$  个 TOV-21G 细胞至小鼠下肋左边部位中。肿瘤植入 10 天后,按照体重和肿瘤大小将小鼠分成 4 组,然后用媒介、sActRIIB、阿霉素或 sActRIIB 和阿霉素的组合处理。此外,将不带有肿瘤的小鼠组用作正常对照并接受 PBS。下表中显示了给药和处理时间表。

[0683] 表 14 :定量施用和治疗时间表

[0684]

组	n	测试物质	剂量 mg/kg	浓度 mg/mL	体积 mL/20g	途 径	给药方案
正常	10	PBS	NA	NA	NA	SC	1 x /周
TOV-21G + PBS	18	PBS	NA	NA	NA	SC	1 x /周
TOV-21G + sActRIIB	14	sActRIIB	10 mg/kg	1	0.2	SC	1 x /周
TOV-21G + DOX	14	DOX	2 mg/kg	0.2	0.2	IP	1 x /周4次 连续 IP 注 射
TOV-21G + sActRIIB + DOX		sActRIIB	10 mg/kg	1	0.2	SC	1 x /周
TOV-21G + sActRIIB + DOX	14	DOX	2 mg/kg	0.2	0.2	IP	1 x /周 4次连续 IP 注射

[0685] 将小鼠每周称重。纵向记录了体重数据。通过使用电子卡尺纵向测量了肿瘤大小。使用以下公式来计算实际肿瘤体积 (Tomayko M 和 Reynolds C, 1989) : (矩形实体肿瘤的体积 : 肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) = 肿瘤的长度 (mm)  $\times$  宽度 (mm)  $\times$  高度 (mm))。在研究结束时,将所有组中的小鼠接受最终的尸检,并使用标准解剖学解剖程序来测定瘦胴体重量 (排除皮肤、脂肪组织、内脏和头)。切除了每只小鼠的左侧和右侧的腓肠肌并称重。所有结果表示为平均值  $\pm$  SEM (平均值的标准误差)。对于统计学分析,结合 MS Excel 5.0 软件使用了标准 2-尾 t-检验以确定统计学差异。认为低于 0.05 的任何 p 值是统计学上显著的。

[0686] 如图 25 中所示的,与不带肿瘤的正常对照小鼠相比,带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠显示出体重的减轻。带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中 sActRIIB 施用有效地防止了体重减轻。阿霉素处理导致 TOV-21G 植入的小鼠中体重进一步的降低 (非统计学上显著的);然而,在第 38 天时与正常对照小鼠相比时,降低是显著的。结合阿霉素施用的 sActRIIB 有效地减轻了体重减轻,如阿霉素处理的 TOV-21G 植入的小鼠中看到的那样。

[0687] 在 4- 周研究期中,每周测量各单个小鼠的肿瘤大小。在第 4 周,通过最终尸检程序记录了肿瘤重量。如图 26 中所示的,与媒介处理的 TOV-21G 组相比,DOX 显著降低了带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的肿瘤大小和肿瘤重量。与媒介处理的带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠相比, sActRIIB 结合 DOX 处理进一步抑制了肿瘤生长和降低了肿瘤大小。在第 38 天,与 DOX 处理的带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠相比, sActRIIB 结合 DOX 处理显著降低了肿瘤大小,肿瘤重量降低了 25%。此外, sActRIIB 和阿霉素对肿瘤抑制具有加和作用。因此, sActRIIB 和阿霉素各自能够抑制裸鼠中 TOV-21G 肿瘤生长,并且在组合时,它们导致更高的 TOV-21G 肿瘤生长的抑制。

[0688] 在 4 周实验结束时,通过尸检程序测定了小鼠瘦胴体重量和腓肠肌重量。如图 27 中所示,与正常对照相比,带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠显示出瘦胴体重量和腓肠肌重量的显著降低;然而, sActRIIB 的施用防止了 TOV-21G 植入裸鼠中瘦胴体重量和腓肠肌重量的减轻。阿霉素对 TOV-21G 异种移植小鼠中瘦胴体重量和腓肠肌质量的减轻没有作用;然而,与 sActRIIB 的联合治疗显著防止了 TOV-21G 植入裸鼠中瘦胴体重量和腓肠肌重量的减轻。因此,单独施用或结合阿霉素施用的 sActRIIB 能够防止带有 TOV-21G 肿瘤小鼠的肌肉丢失。

[0689] 单独施用或结合阿霉素施用的 sActRIIB 抑制了 TOV-21G 异种移植肿瘤生长和减弱了带有肿瘤的裸鼠中的肌肉萎缩。此外, sActRIIB 和阿霉素显示出对裸鼠中的 TOV-21G 异种移植肿瘤生长的抑制具有加和作用。

[0690] 实施例 10 :用激活素 A 抗体的激活素 A 阻断对雌性抑制素  $\alpha$  敲除小鼠的体重、肌肉质量、瘦体重和脂肪质量、器官重量、卵巢肿瘤生长和肿瘤血管生成因子表达的作用

[0691] 这个研究的目的是检验激活素 A 抗体对具有建立的卵巢肿瘤和恶病质的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中的循环激活素 A 水平、体重、瘦体重和脂肪质量、肌肉和器官肿瘤及卵巢肿瘤重量,以及肿瘤血管生成因子 (VEGF 和 Ang-1) 表达水平的作用。

[0692] 从 Dr. Martin M. Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston, TX) 获得 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的许可。以混合的 C57BL6/129S6/SvEv 遗传背景来维持小鼠,并且群体在 Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA) 繁殖。使用基因组尾 DNA 通过 PCR 进行了 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的基因型测定,并由 Genetically Engineered Models and Services (Charles River Laboratories, Inc. Wilmington, MA) 来进行。

[0693] 每周注射,4 周实验

[0694]

组 No.	处理	n	途径	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	体积 (mL)	给药时间 表
1 (WT)	PBS	6	SC	-	0	0.1	1x/周
2 (WT)	激活素 A Ab	5	SC	20	6	0.1	1x/周
3 (Inh $\alpha$ KO)	PBS	9	SC	-	0	0.1	1x/周
4 (Inh $\alpha$ KO)	激活素 A Ab	9	SC	20	6	0.1	1x/周

[0695] 八周大的雌性 *Inh α* KO 小鼠皮下 (SC) 注射 20mg/kg 激活素 A 抗体或 PBS (媒介对照)。使用的激活素 A 抗体与以上材料部分描述的相同。年龄匹配的 WT 同窝对照小鼠注射 20mg/kg 激活素 A 抗体或 PBS (用作基线对照)。每周注射,持续 4 周。在 4 周研究结束时,通过心脏穿刺抽取末端血样,并将血清存储在  $-80^{\circ}\text{C}$  用于激活素 A 分析。根据制造商提供的实验方案,使用 MSD 标准平板来检测游离激活素 A 水平。将尸检时收集的血清用于该试验中。通过按照提供的实验方案使用 VEGF 免疫分析试剂盒来检测 VEGF (血管内皮生长因子) 水平。

[0696] 每周记录一次小鼠体重,持续 4 周。根据制造商提供的实验方案使用 Mini Spec NMR 成像仪 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, 德国),在第 0 周和第 4 周通过核磁共振 (NMR) 成像分析了身体组成 (瘦质量和脂肪质量)。在 4 周研究结束时,所有动物在  $\text{CO}_2$  室中安乐死,并接受最终的尸检程序。安乐死后立即切除 *Inh α* KO 小鼠的腓肠肌和卵巢以及子宫,并称重。

[0697] 将小鼠卵巢和卵巢肿瘤在锌-福尔马林中固定用于石蜡封闭。将  $4\ \mu\text{m}$  厚的石蜡切片用于 IHC。通过在 Unmask 溶液 (Vector H-3300) 中微波 3min 来进行抗原复原。在室温下 CAS (Zymed Lab 00-8120) 中非特异性染色封闭 30 分钟。稀释于 CAS 中的一抗是:兔抗血管生成素 1 (Abcam ab8451) 1:500;兔抗 VEGF (Abcam ab46154) 1:150。在室温下孵育 3 小时。通过 Vector Elite 兔 IgG ABC 试剂盒 (pk-6101) 连接二抗。将 Vector SG 试剂盒 (SK-4700) 用于蓝/灰染色,在 Fast Red (Vector H-3403) 中核复染。所有结果表示为平均值  $\pm$  平均值的标准误差 (SEM)。使用 Student's 2-尾 t-检验对所有数据分析激活素 A 抗体处理组和 PBS-处理组之间差异的统计学显著性。通过  $p < 0.05$  值来表示组之间的统计显著性。

[0698] 与 WT 对照组相比,*Inh α* KO 小鼠中的血清激活素 A 水平显著升高。处理 4 周后,激活素 A 抗体的注射完全消除了 *Inh α* KO 小鼠中血清激活素 A 的提高 (图 28)。在 1 周处理内,与 PBS 处理的 *Inh α* KO 和 WT 同窝小鼠相比,*Inh α* KO 小鼠中激活素 A 抗体的施用显著提高了体重。显著的体重增加持续到第 4 周。在这一 4 周期间,用 PBS 处理的 *Inh α* KO 小鼠的体重保持恒定。在 WT 同窝小鼠组中,激活素 A 抗体对体重没有影响 (图 29)。

[0699] 如通过 NMR 成像所揭示的,雌性 *Inh α* KO 小鼠中 20mg/kg 激活素 A 抗体的施用导致瘦体重的显著提高,在第 4 周时超过 PBS 处理的 *Inh α* KO 小鼠和 WT 同窝小鼠。相反,用 PBS 处理的 *Inh α* KO 小鼠与 WT 小鼠和激活素 A 抗体处理的 *Inh α* KO 小鼠相比,具有明显较低的瘦体重。在 WT 同窝小鼠对照组中,激活素 A 抗体对瘦体重没有作用。在 4-周处理期结束时,*Inh α* KO 小鼠中的激活素 A 抗体将脂肪质量提高至 WT 同窝小鼠对照组的水平,并且显著高于用 PBS 处理的 *Inh α* KO 小鼠的水平。在 WT 同窝小鼠对照组中,激活素 A 抗体对脂肪质量没有显著作用 (图 30)。

[0700] 在研究结束时,通过最终尸检程序测量了腓肠肌质量。与 PBS 处理的 *Inh α* KO 小鼠和 WT 同窝小鼠对照组相比,*Inh α* KO 小鼠的激活素 A 抗体施用导致了显著提高的肌肉质量。激活素 A 抗体对 WT 同窝小鼠对照组中的腓肠肌质量没有显著作用 (图 31)。

[0701] 在研究结束时,通过尸检程序检验了卵巢和子宫 (只有 *Inh α* KO 小鼠)。数据揭示了所有雌性 *Inh α* KO 小鼠产生了大的出血性卵巢肿瘤。*Inh α* KO 小鼠的卵巢的毛重明显高于 WT 同窝小鼠对照组。与用 PBS 处理的 *Inh α* KO 小鼠中的肿瘤相比,*Inh α* KO 小鼠中的激



活素 A 抗体的施用导致显著降低的肿瘤大小。此外,用 PBS 的 Inh  $\alpha$  KO 组中的大部分子宫扩大,充满流体。激活素 A 抗体处理将子宫重量显著降低 90%。激活素 A 抗体对 WT 同窝小鼠对照组中的卵巢重量没有作用(图 32)。

[0702] 血清 VEGF ELISA 揭示了患有晚期卵巢肿瘤的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠在其循环中具有大幅提高的 VEGF 水平(图 33)。在来自 PBS 处理的 Inh  $\alpha$  KO 小鼠的卵巢肿瘤切片中,VEGF 和血管生成素-1(Ang-1)免疫反应性显著提高。激活素 A 抗体治疗消除了卵巢中 VEGF 和 Ang-1 的诱导(图 34)。

[0703] 来自本研究的结果表明雌性 Inh  $\alpha$  KO 小鼠中每周 20mg/kg 剂量的激活素 A 抗体,持续 4 周,降低了循环激活素水平,改善了恶病质,抑制了卵巢肿瘤生长和降低了肿瘤血管生成因子的表达。激活素 A 抗体施用显著提高了体重和骨骼肌质量,降低了卵巢肿瘤大小和消除了 Inh  $\alpha$  KO 小鼠卵巢中的 VEGF 和 Ang-1 过表达。

[0704] 实施例 11:激活素 A 抗体结合阿霉素对植入 TOV-21G 卵巢癌的雌性裸鼠中肿瘤生长、体重和肌肉质量的作用

[0705] 这个研究的目的是检验激活素 A 抗体、阿霉素和激活素 A 抗体加阿霉素的药理学施用对植入了 TOV-21G 卵巢异种移植肿瘤的裸鼠中体重、肿瘤生长和肌肉质量的作用。使用的激活素 A 抗体与以上材料部分描述的相同。八周大的雌性无胸腺裸鼠每只皮下(SC)注射  $2.2 \times 10^6$  个 TOV-21G 细胞至小鼠下肋左边部位中。肿瘤植入第 12 天时,按照体重和肿瘤大小将小鼠分成 4 组,然后用媒介、激活素 A 抗体、阿霉素或激活素 A 抗体和阿霉素的组合处理。此外,将不带有肿瘤的小鼠组用作正常对照并接受 PBS。下表中显示了给药和处理时间表。

[0706]

组	n	测试物质	剂量 mg/kg	浓度 mg/mL	体积 mL/20g	途径	给药方案
正常	8	PBS	NA	NA	NA	SC	1x/周
TOV-21G + PBS	14	PBS	NA	NA	NA	SC	1x/周
TOV-21G + 激活素-A Ab	14	激活素-A Ab	20 mg/kg	2	0.2	SC	1x/周
TOV-21G + DOX	14	DOX	4 mg/kg	0.4	0.2	IP	1x/周 4次 IP 注射
TOV-21G + 激活素-A Ab +DOX	14*	激活素-A Ab	20 mg/kg	2	0.2	SC	1x/周
		DOX	4 mg/kg	0.4	0.2	IP	1x/周 4次连续 IP 注射

[0707] \*组 5 中的两只小鼠被笼子中的其他小鼠杀死,它们是一笼多只的(4 只小鼠/笼)

[0708] 将小鼠每周称重。纵向记录了体重数据。通过使用电子卡尺(Fred V. Fowler Company, Inc.)纵向测量了肿瘤大小。使用以下公式来计算实际肿瘤体积(Tomayko 和 Reynolds, 1989):矩形实体肿瘤的体积:肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 肿瘤的长度(mm)  $\times$  宽度(mm)  $\times$  高度(mm)。在研究结束时,将所有组中的小鼠接受最终的尸检,并使用标准解剖学解剖程序来测定瘦胴体重量(排除皮肤、脂肪组织、内脏和头)。切除了每只小鼠的左侧和右侧腓肠肌并称量。所有结果表示为平均值  $\pm$  SEM(平均值的标准误差)。对于统计学分析,使用了

标准 2-尾 t-检验确定统计学差异。认为低于 0.05 的任何 p 值是统计学上显著的。

[0709] 如图 35 中所示的,与不带肿瘤的正常对照小鼠相比,带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠显示出显著的体重减轻。激活素 A 抗体的施用防止了带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中的体重减轻。阿霉素处理导致 TOV-21G 植入的小鼠中体重进一步的降低(非统计学显著的)。使用激活素 A 抗体和阿霉素的联合处理似乎比单独的阿霉素处理引起较少的体重减轻(非统计学上显著的)。

[0710] 在整个 5-周研究期中,每周测量各单个小鼠的肿瘤大小。在第 5 周,通过最终尸检程序记录了肿瘤重量。如图 36 和图 37 中所示的,与媒介处理的带有 TOV-21G 的小鼠相比,在第 47 天时观察到激活素 A 抗体处理的带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠中肿瘤大小和肿瘤重量的统计学显著的降低。此外,激活素 A 抗体和阿霉素的联合处理对肿瘤抑制具有加和作用。因此,激活素 A 抗体或阿霉素各自能够抑制裸鼠中的 TOV-21G 肿瘤生长,并且当两种药剂组合时,它们导致更高的 TOV-21G 肿瘤生长的抑制。

[0711] 在 5 周实验结束时,通过尸检程序测定了小鼠瘦胴体重量和腓肠肌重量。如图 38 中所示,与正常对照相比,带有 TOV-21G 肿瘤的小鼠显示出瘦胴体重量和腓肠肌重量的显著降低;然而,激活素 A 抗体的施用防止了 TOV-21G 植入裸鼠中瘦胴体重量和腓肠肌重量的减轻。阿霉素处理对 TOV-21G 异种移植小鼠中的瘦胴体重量和腓肠肌质量的减轻没有作用;然而,与激活素 A 抗体的联合治疗减弱了 TOV-21G 植入裸鼠中瘦胴体重量和腓肠肌重量的减轻。因此,单独施用或结合阿霉素施用的激活素 A 抗体能够防止带有 TOV-21G 肿瘤小鼠的肌肉损失。

[0712] 单独施用或结合阿霉素施用的激活素 A 抗体抑制了 TOV-21G 异种移植肿瘤生长,并且还减轻了带有肿瘤的裸鼠中的肌肉萎缩。此外,激活素 A 抗体处理对裸鼠中的 TOV-21G 异种移植肿瘤生长的抑制显示出与阿霉素化疗具有加和作用。

[0713] 尽管已经参照优选的实施方案和各种可替换的实施方案特别地显示和描述了本发明,但相关领域的技术人员将理解其中可以进行形式和细节的各种改变而不脱离本发明的精神和范围。

[0714] 本申请说明书正文中引用的所有参考文献、授权专利和专利申请将其全部按引用并入本文中用于所有目的。

[0715] 参考文献

[0716] Alibhai, SMH, Gogov S, Allibhai Z. Long-term side effects of androgen deprivation therapy in men with non-metastatic prostate cancer: a systematic literature review. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 2006 ;60:201-15.

[0717] Chang KP, Kao HK, Liang Y 等 Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol*. 2010 ;17:1945-1956.

[0718] Cobellis L, Reis FM, Luisi S 等 High concentrations of activin A in the peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig*. 2004 ;11:203-206.

[0719] de Kretser DM, Hedger MP 和 Phillips DJ. Activin A and follistatin: their role in the acute phase reaction and inflammation. *Journal of Endocrinolo*

gy. 1999;161:195-198.

[0720] Doherty TJ. Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol*. 2003 ;95:1717-27.

[0721] Do TV, Kubba LA, Antenos M, Rademaker AW, Sturgis CD 和 Woodruff TK. The role of activin A and Akt/GSK signaling in ovarian tumor biology. *Endocrinology*. 2008 ; 149:3809-16.

[0722] Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin: rationale for use in solid tumours. *Drugs*. 1997 ;54(suppl4):15 - 21.

[0723] Harada K, Shintani Y, Sakamoto Y, Wakatsuki M, Shitsukawa K 和 Saito S. Serum immunoreactive activin A levels in normal subjects and patients with various diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 ;81:2125-2130.

[0724] Hubner G, Alzheimer C 和 Werner S. Activin: a novel player in tissue repair processes. *Histology&Histopathology*. 1999 ;14:295-304.

[0725] Jones KL, de Kretser DM, Patella S 和 Phillips, DJ. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Molecular&Cellular Endocrinology*. 2004 ; 225:119-125.

[0726] Lambert-Messerlian GM, DePasquale SE, Maybruck WM, Steinhoff MM 和 Gajewski WH. Secretion of activin A in recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1999 ;74:93-97.

[0727] Lee SJ, Reed LA, Davies MV 等 Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 ;102:18117-22.

[0728] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl. Acad. Sci., USA*. 2001 ;98:9306-9311.

[0729] Luisi S, Florio P, Reis FM 和 Petraglia F. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. *European Journal of Endocrinology*. 2001 ;145:225-236.

[0730] MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, Dunn, GP, Baracos VE. Understanding and managing cancer cachexia. *J Am Coll Surg*. 2003 ;197:143 - 61.

[0731] Matzuk MM, Finegold MJ, Su JGJ, Hsueh AJW, Bradley A.  $\alpha$ -inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*. 1992 ; 360:313-19.

[0732] Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 ;91:8817-21.

[0733] Morley JE, Thomas DR, Wilson M-MG. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr*. 2006 ;83:735-43.

[0734] Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R, Fanelli FR. Prevention and treatment of cancer cachexia: new insights into an old problem. *Eur J Cancer*. 2006 ;42:31-41.

- [0735] Provencher DM, Lounis H, Champoux L 等 Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cellular&Developmental Biology Animal*. 2000. 36:357-361.
- [0736] Roth SM, Walsh S. Myostatin: A therapeutic target for skeletal muscle wasting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 ;7:259-63.
- [0737] Roubenoff R. Origins and clinical relevance of sarcopenia. *Can J Appl Phys*. 2001 ;26:78-89.
- [0738] Roubenoff R, Heymsfield SB, Kehayias JJ, Cannon JG, Rosenberg IH. Standardization of nomenclature of body composition in weight loss. *Am J Clin Nutr*. 1997 ;66:192-96.
- [0739] Tomayko M 和 Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic(nude)mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989 ;24:148-154
- [0740] Wildi S, Kleeff J, Maruyama H, Maurer CA, Buchler MW 和 Korc M. Overexpression of activin A in stage IV colorectal cancer. *Gut*. 2001 ;49:409-417.
- [0741] Yoshinaga K, Mimori K, Yamashita K, Utsunomiya T, Inoue H 和 Mori M. Clinical significance of the expression of activin A in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 2003 ;22:75-80.
- [0742] Zhou X, Wang JL, Lu J 等 Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*. 2010 ;142:531-543.
- [0743] Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG 等 Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*. 2002 ;296:1486-88.

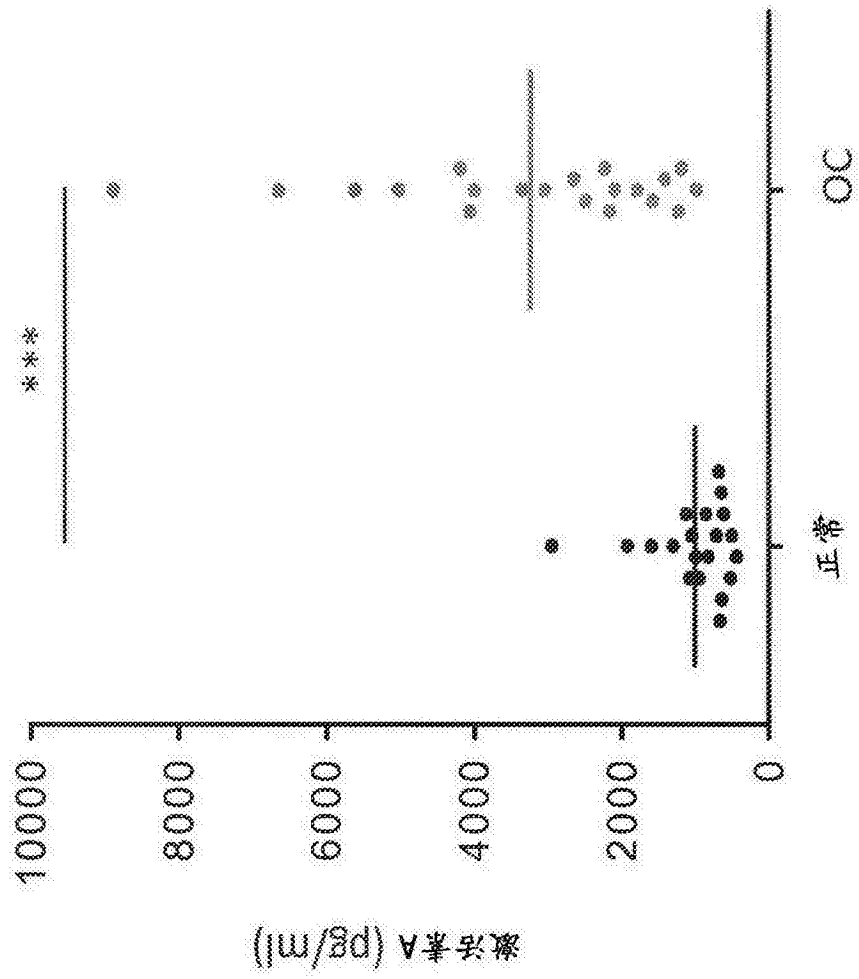


图 1

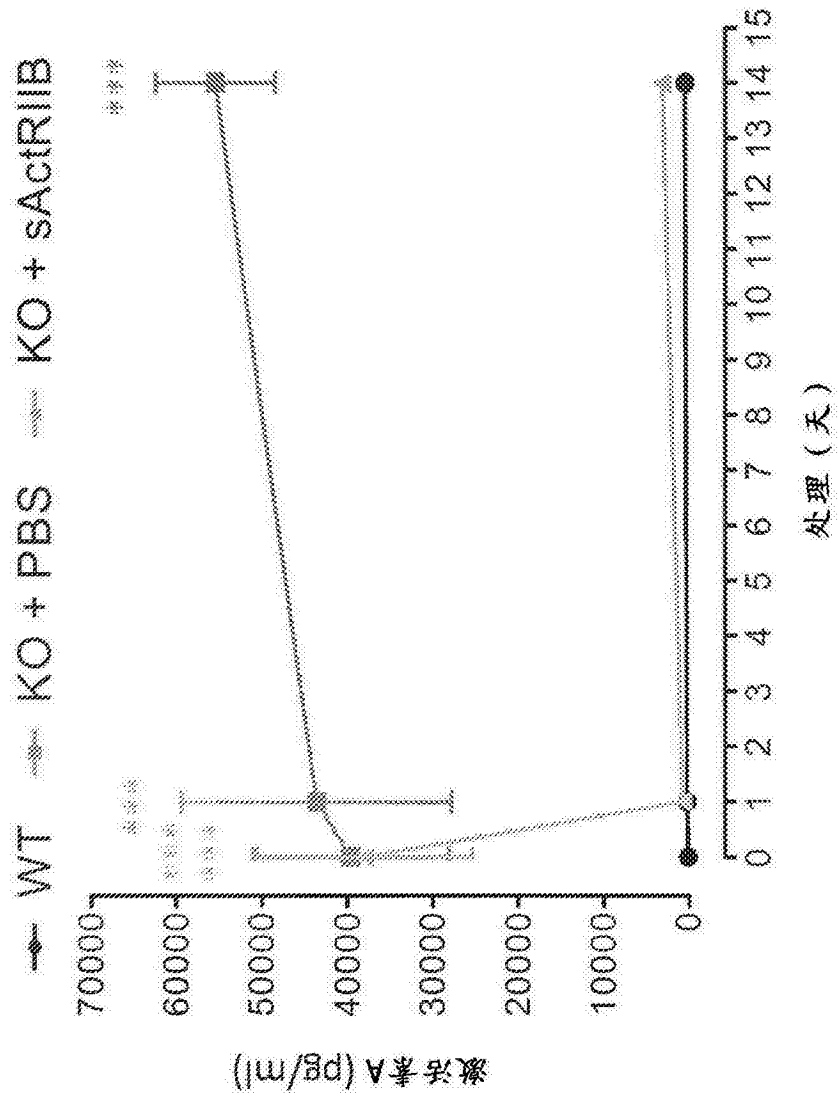


图 2A

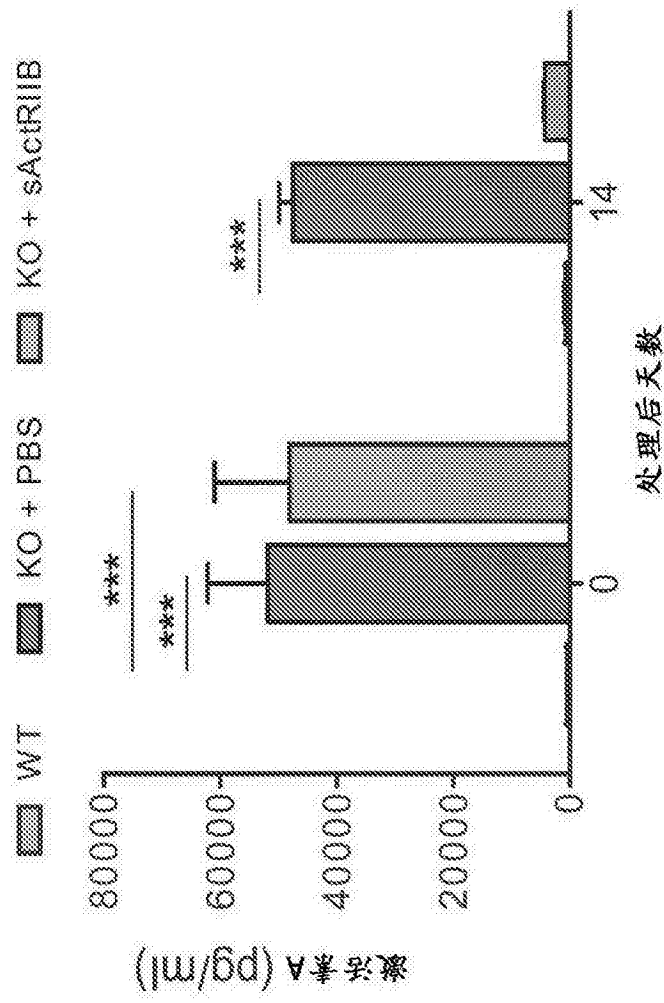


图 2B

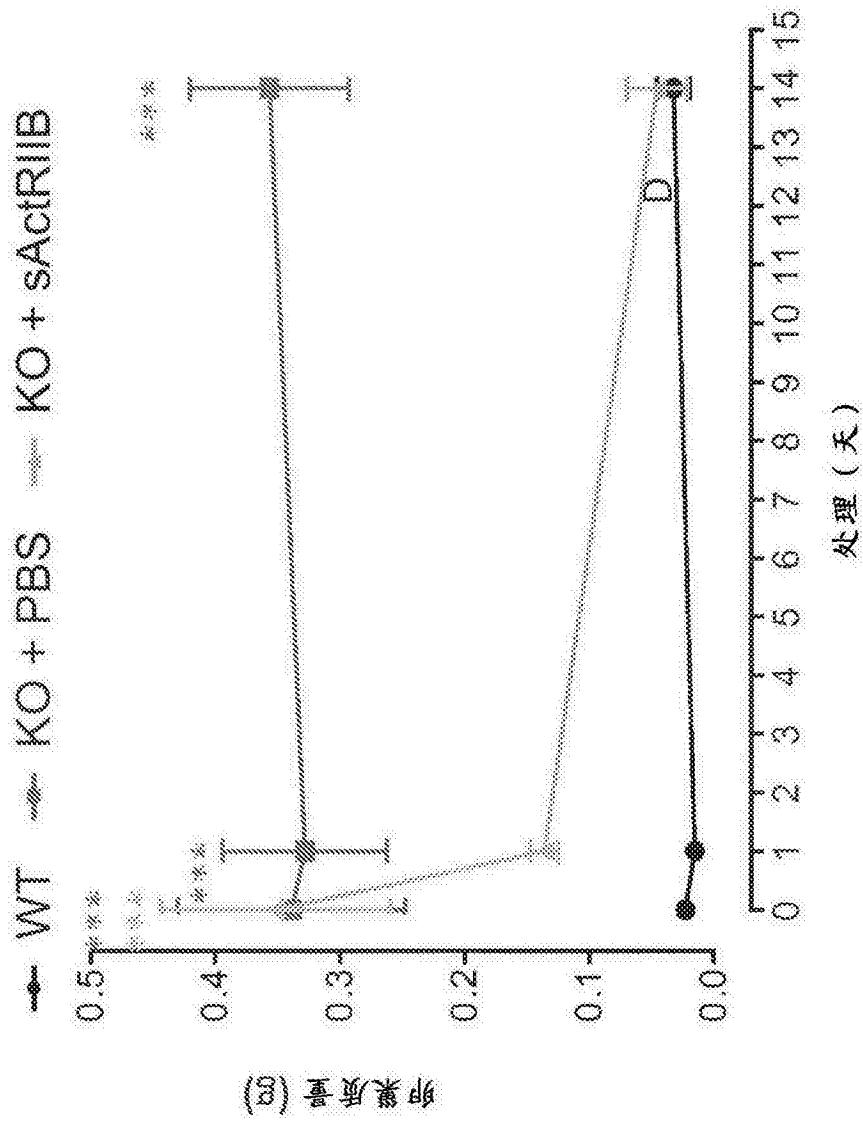


图 3A



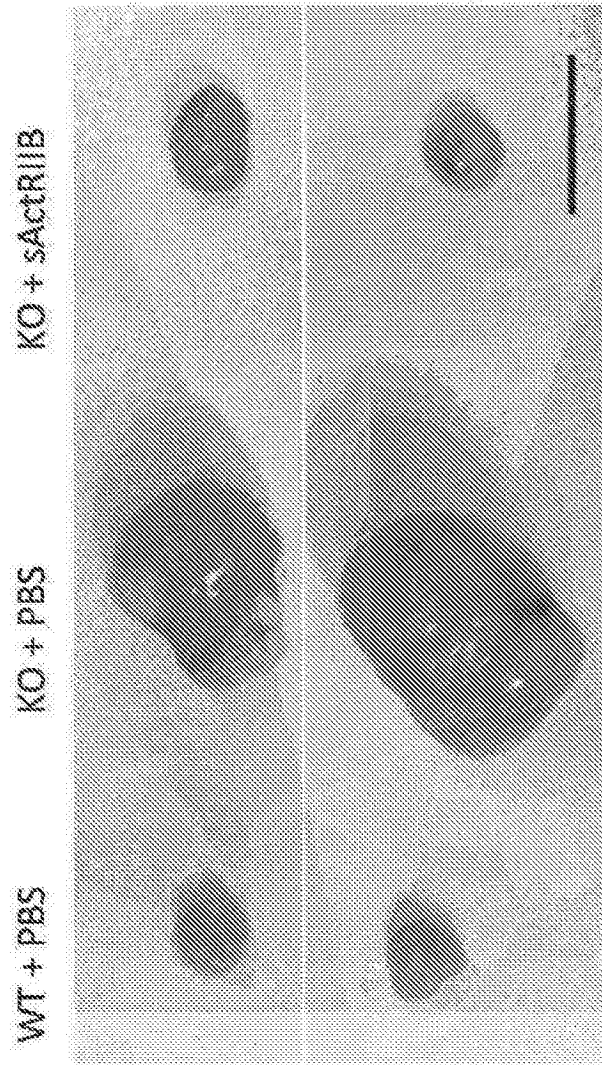


图 3B

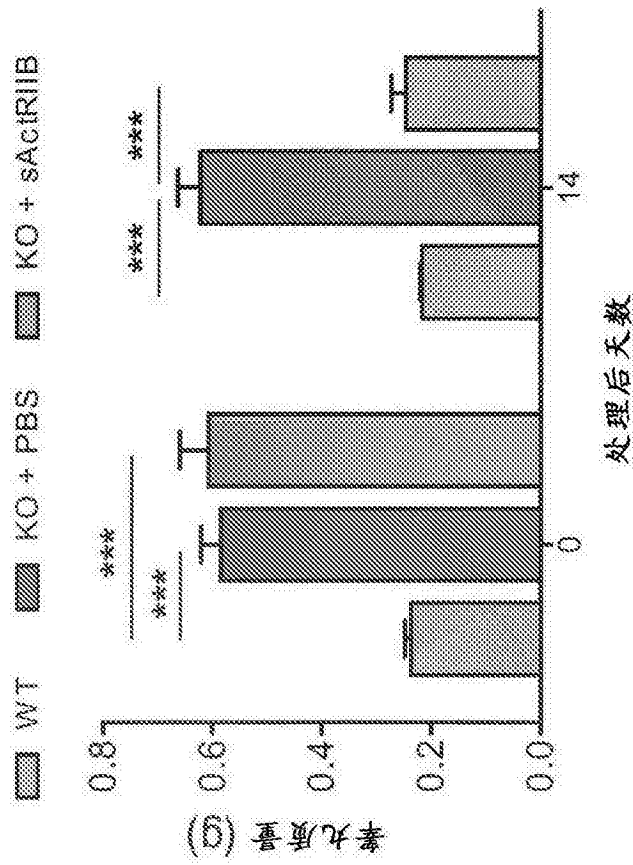


图 4A

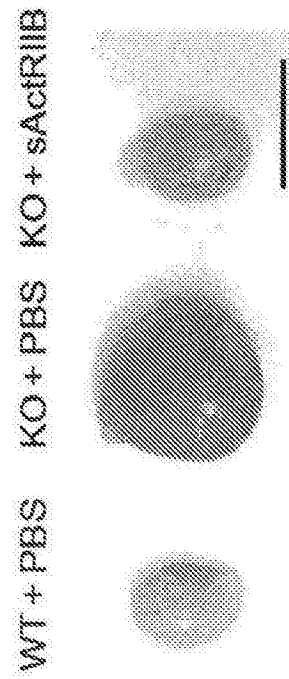


图 4B

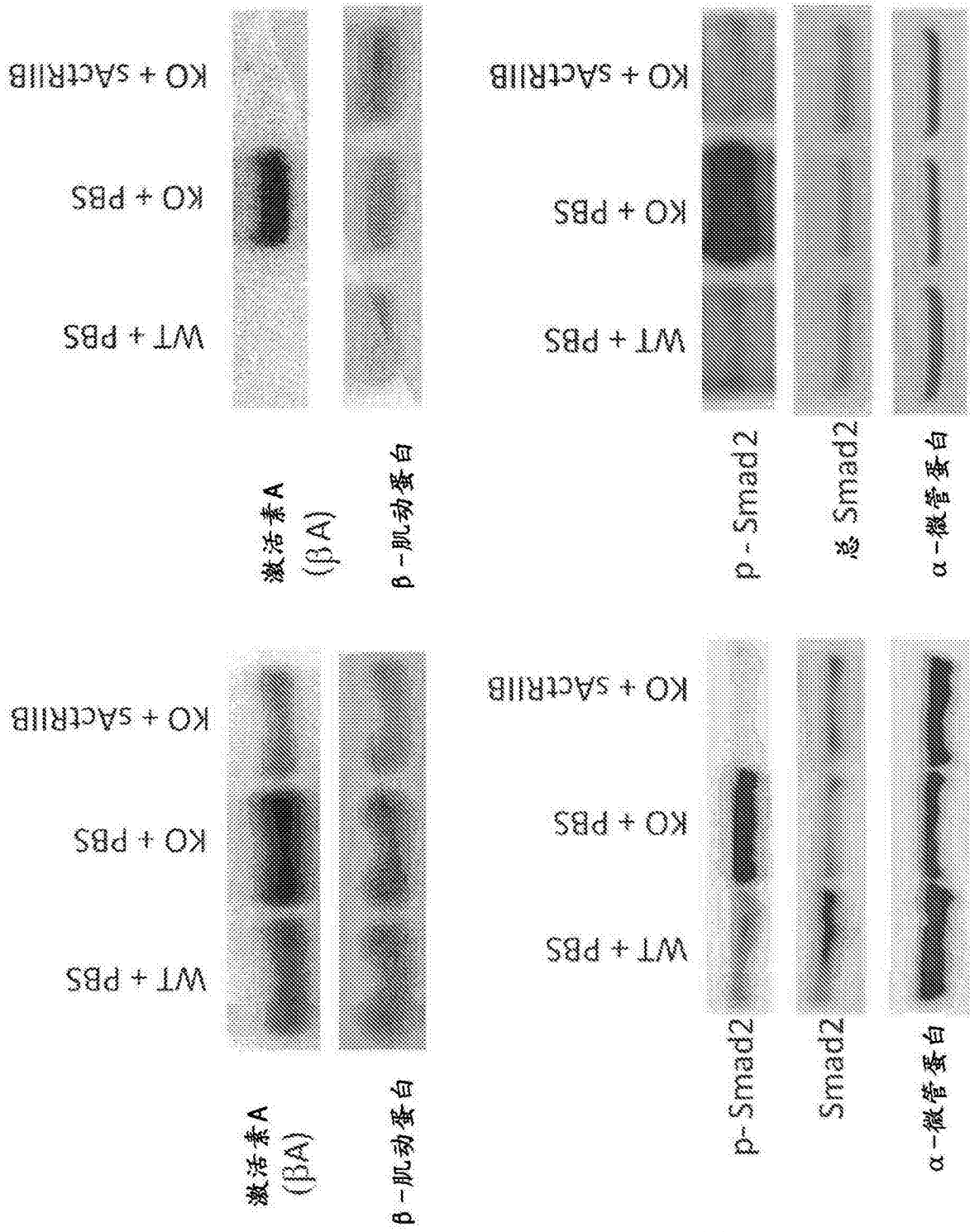


图 5A

图 5B

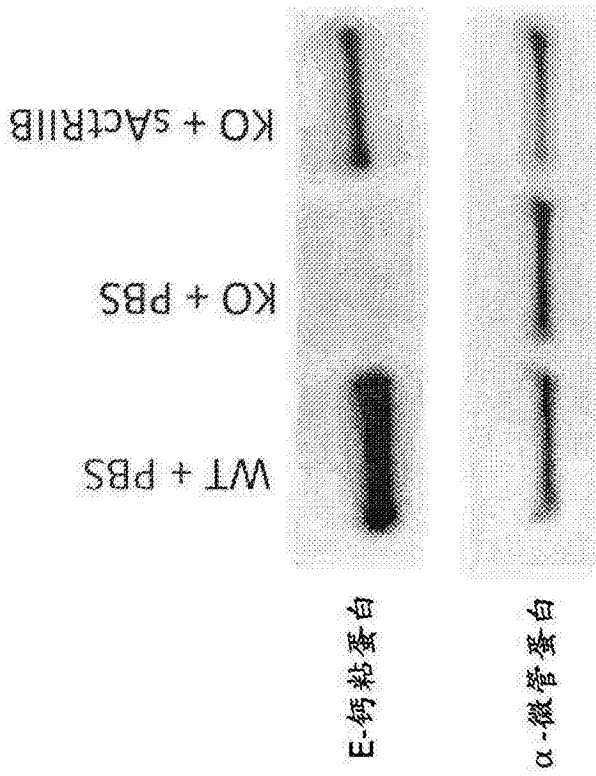


图 6A

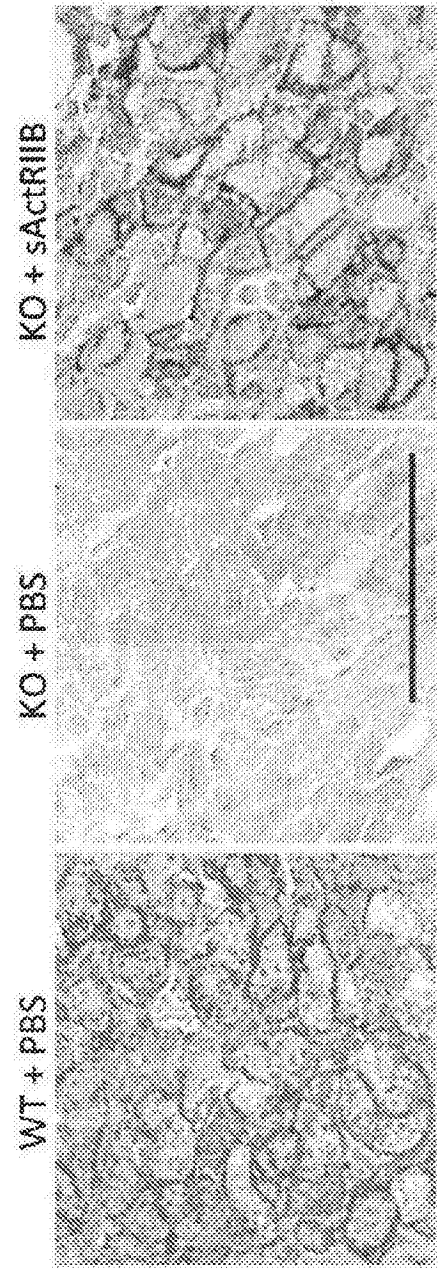


图 6B

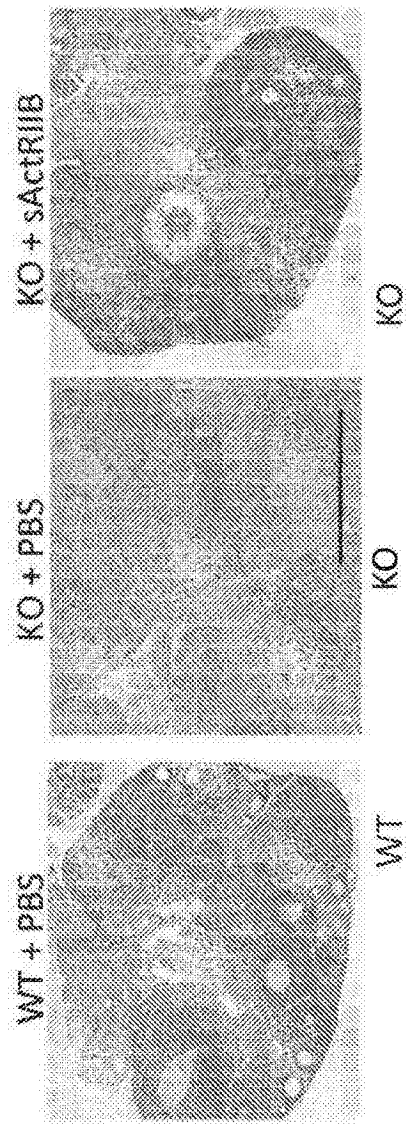


图 7A

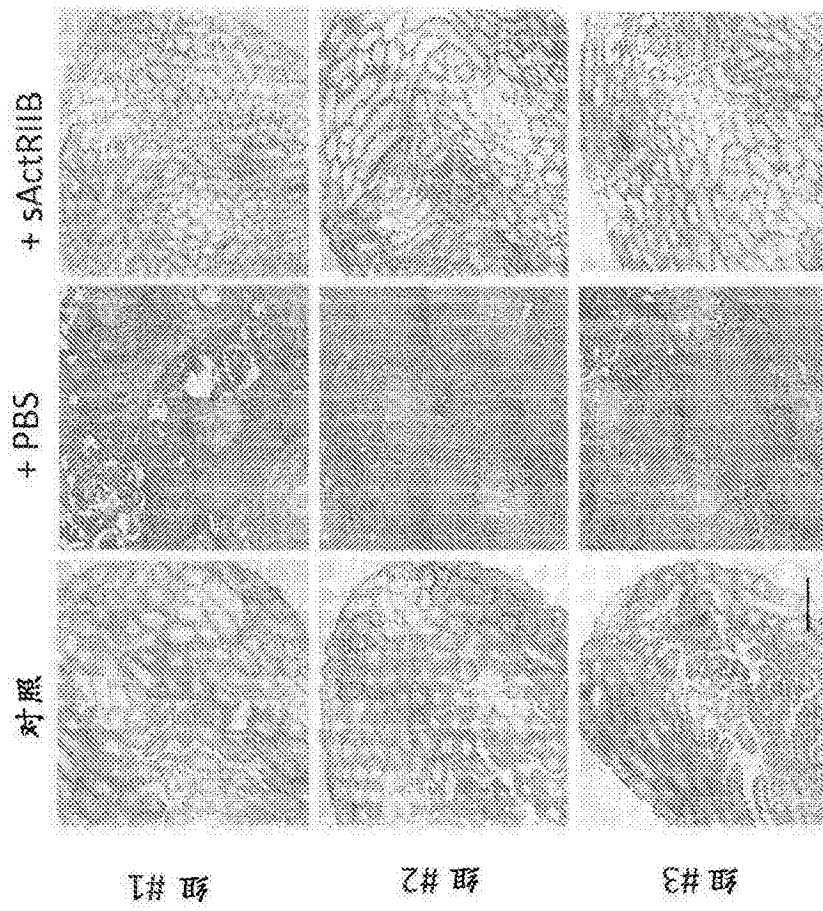


图 7B

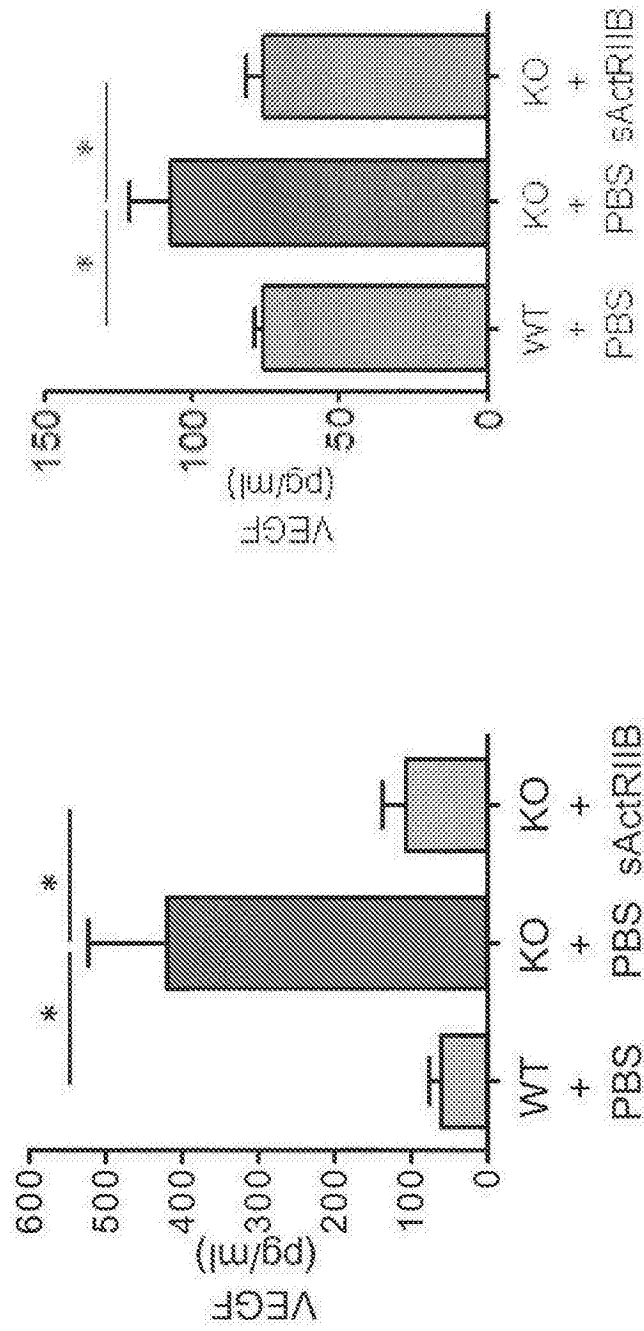


图 8A

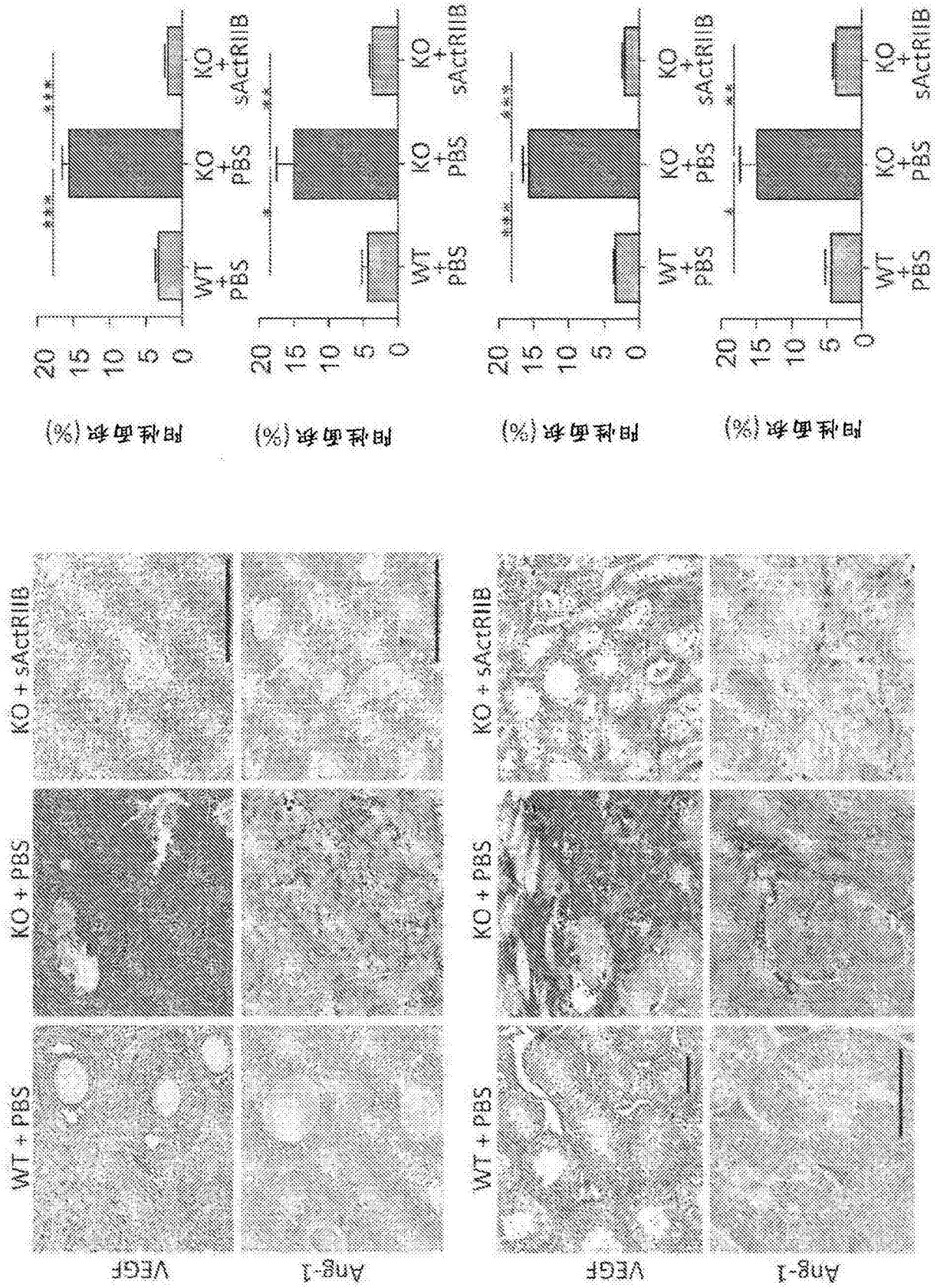


图 8B



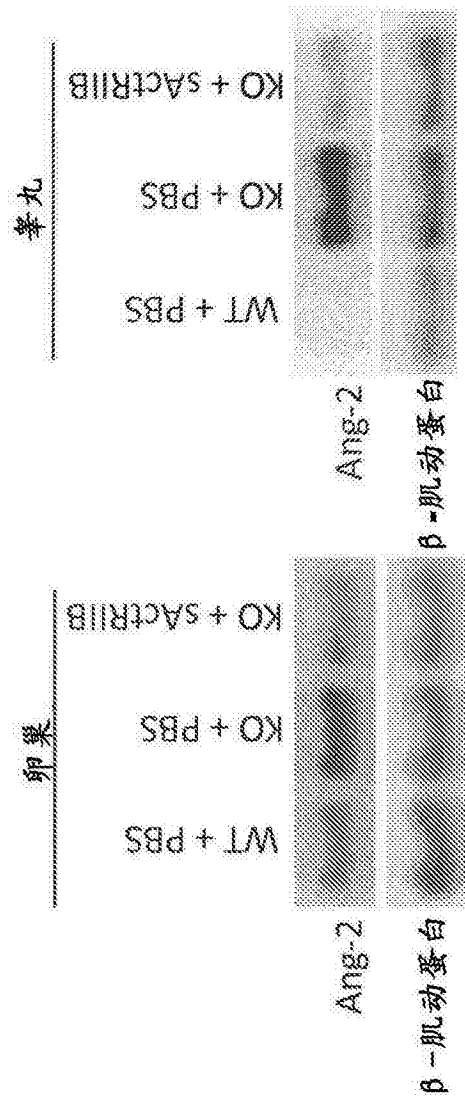


图 8C

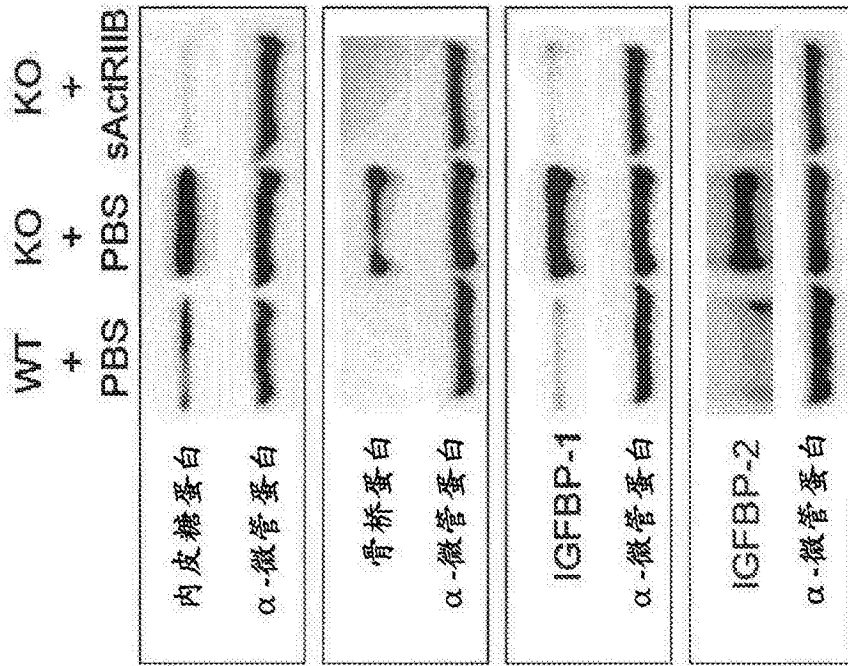


图 8D

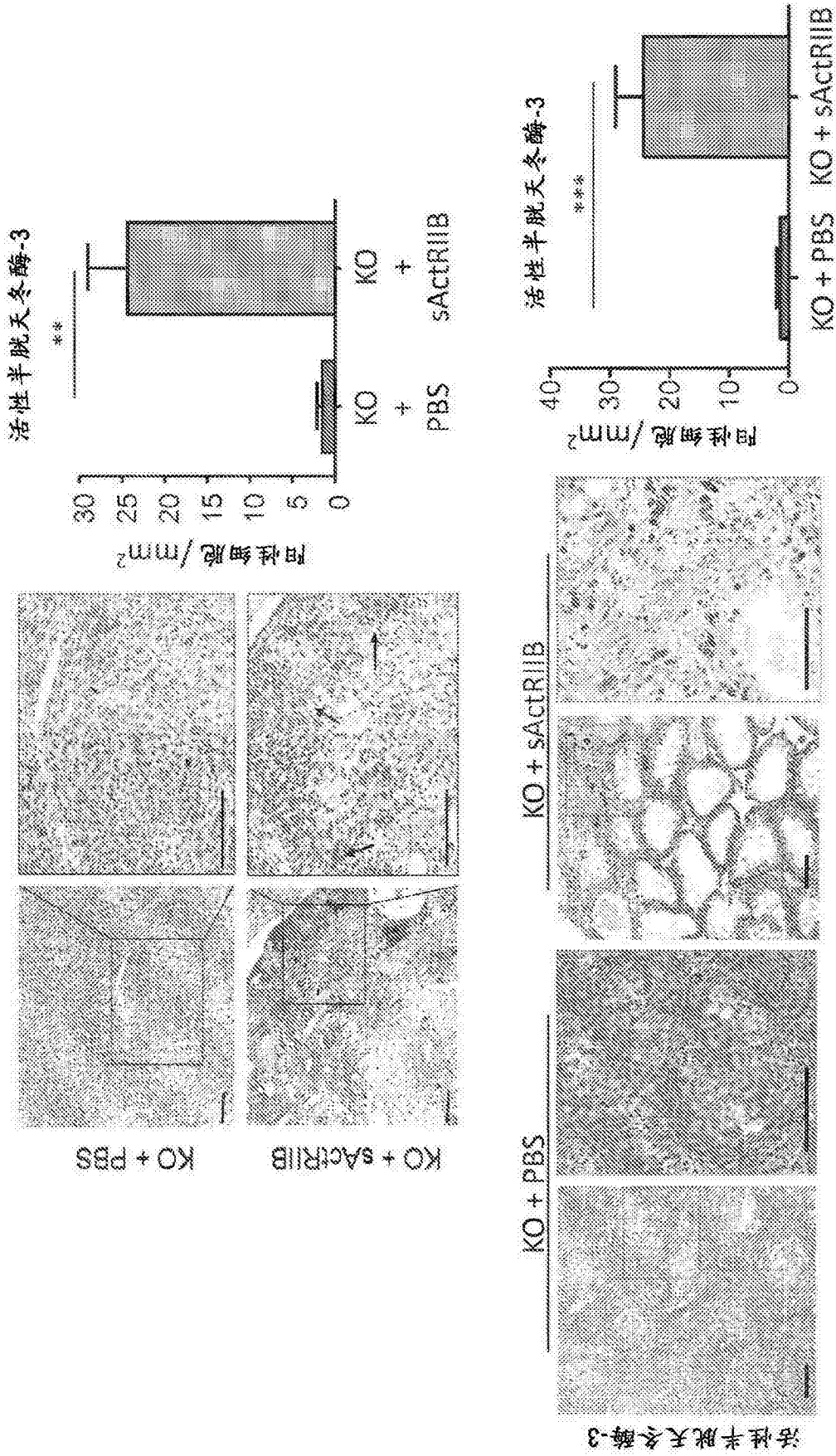


图 9

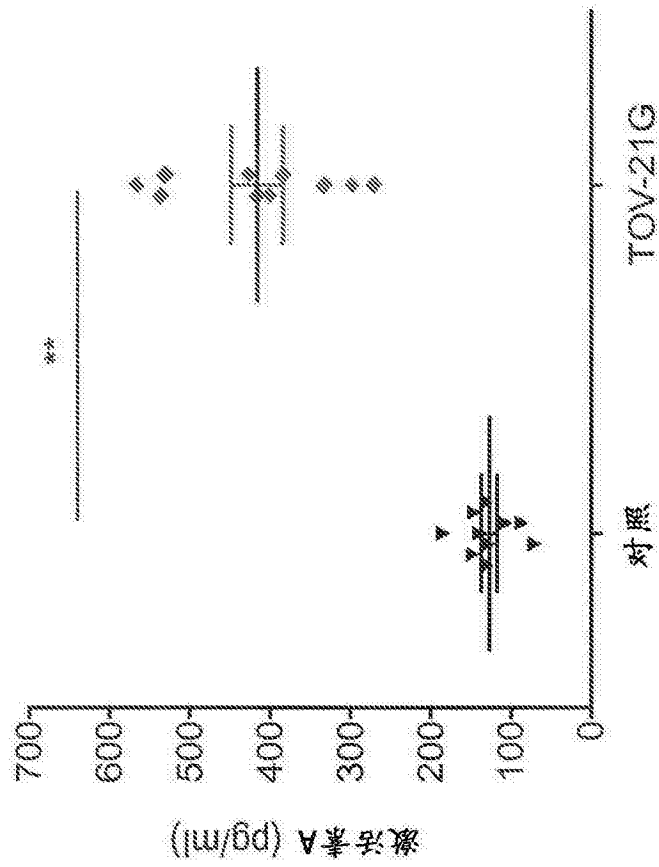


图 10A

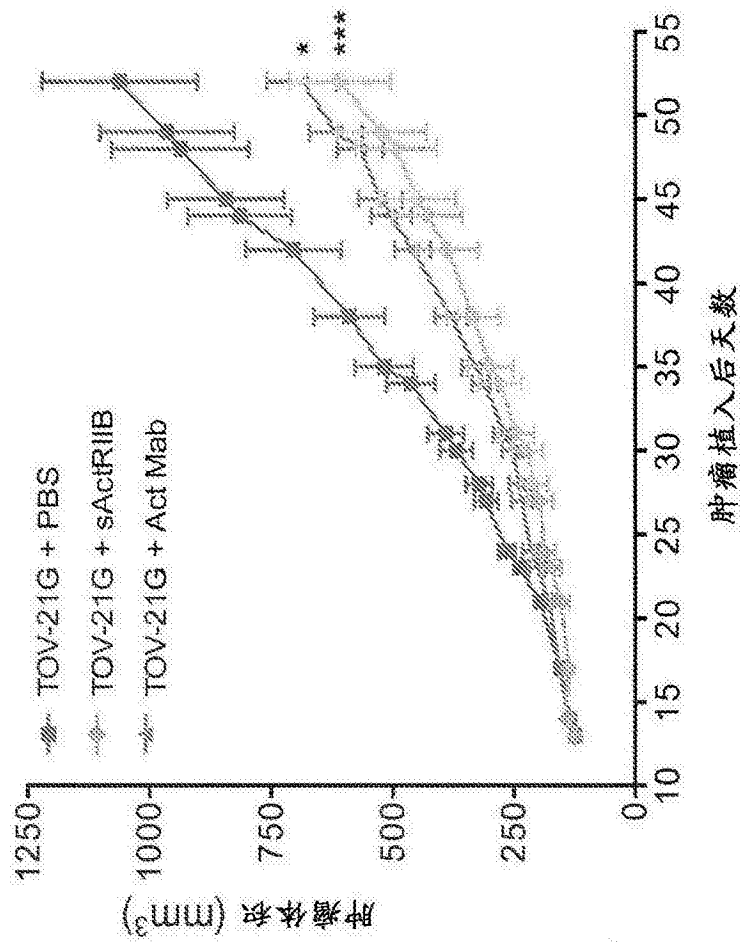


图 10B

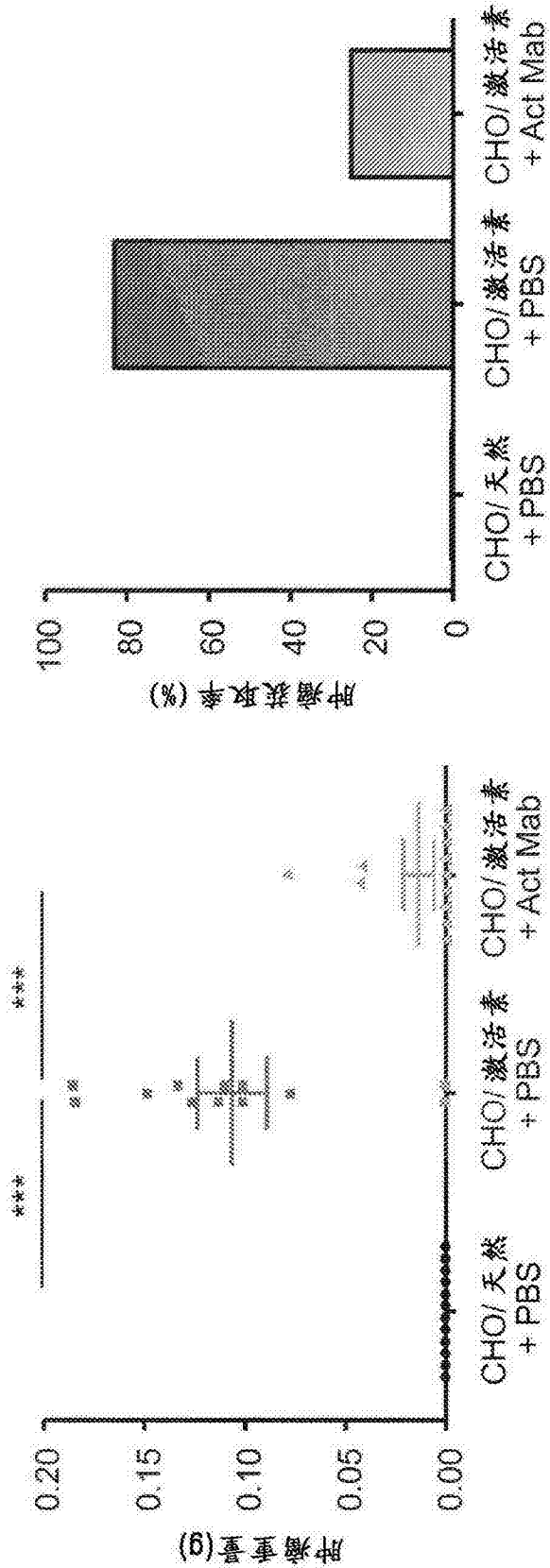


图 11

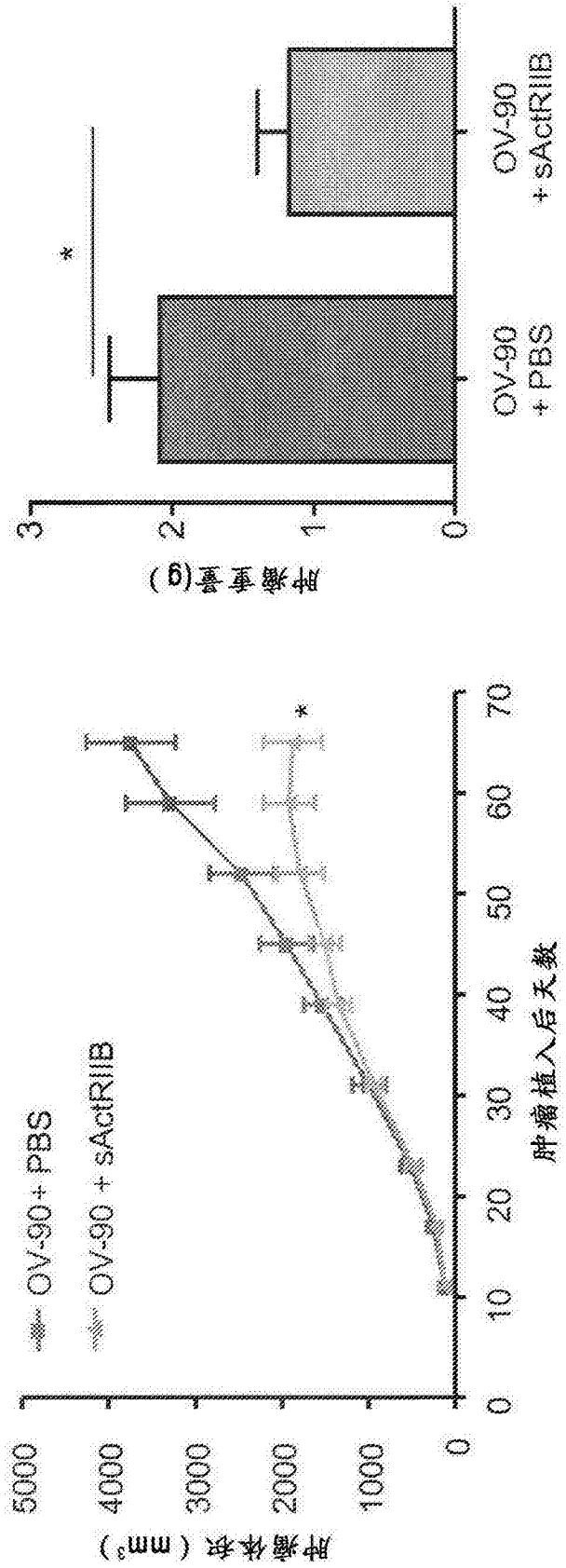


图 12

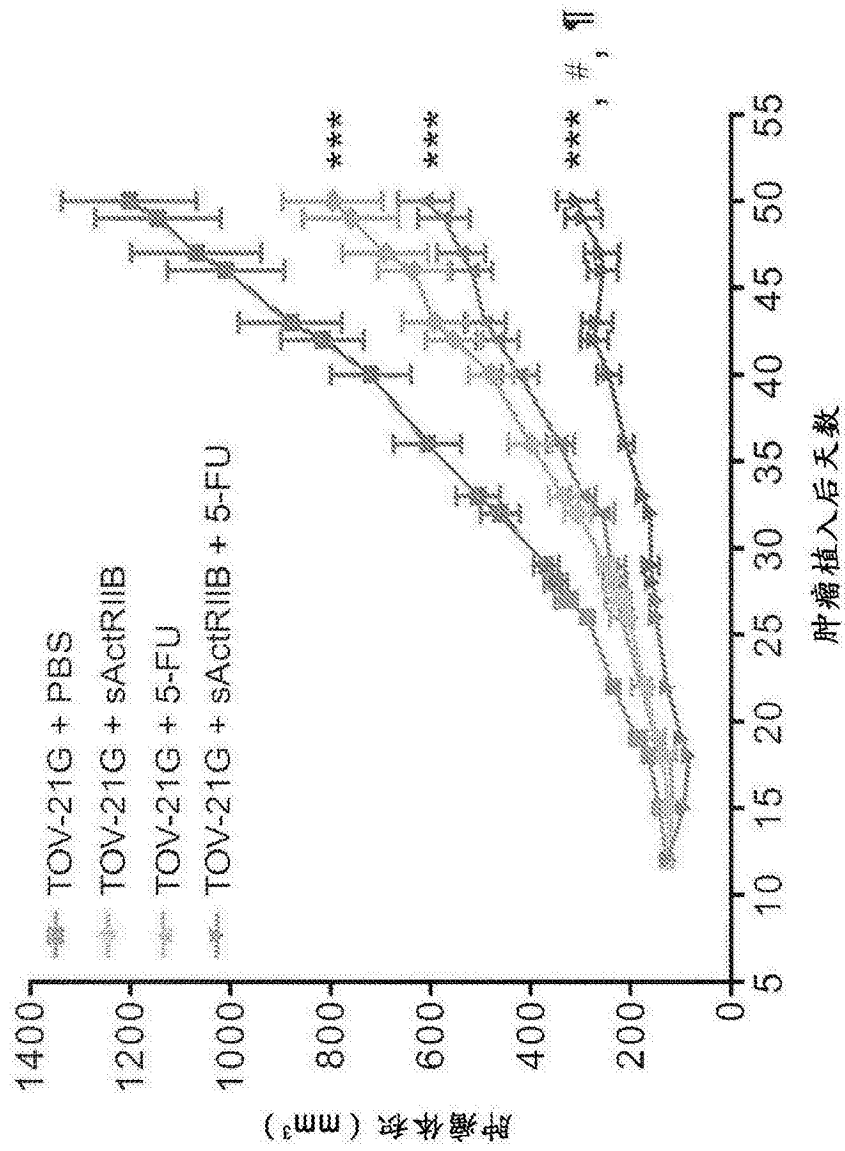


图 13

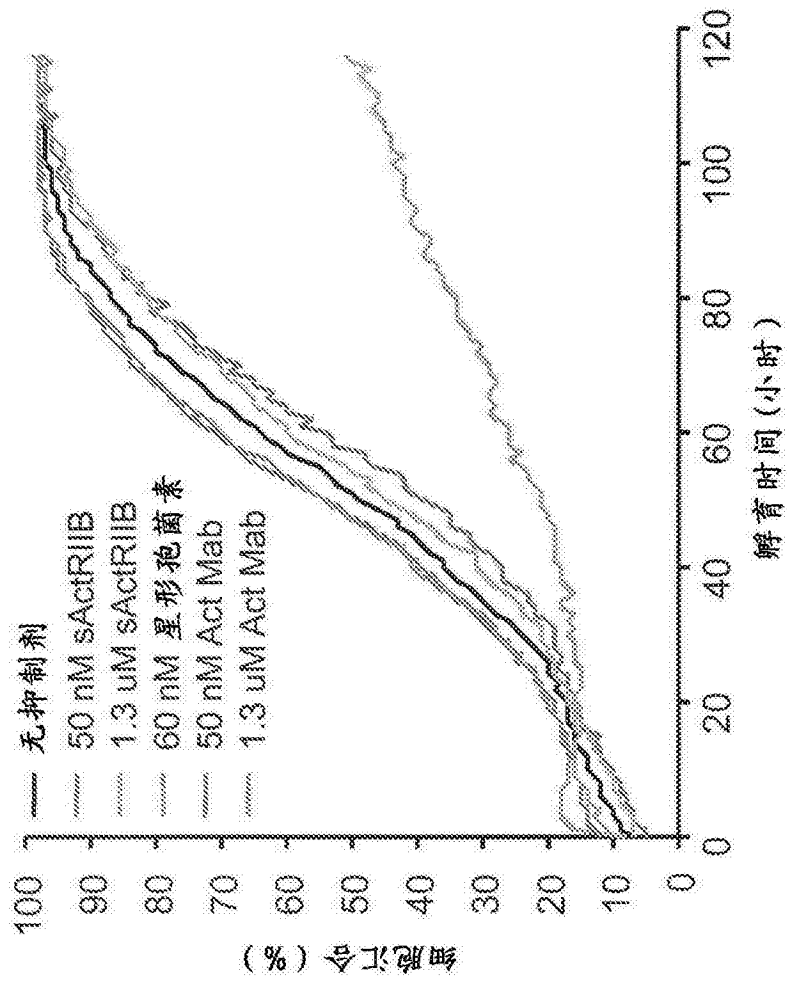


图 14



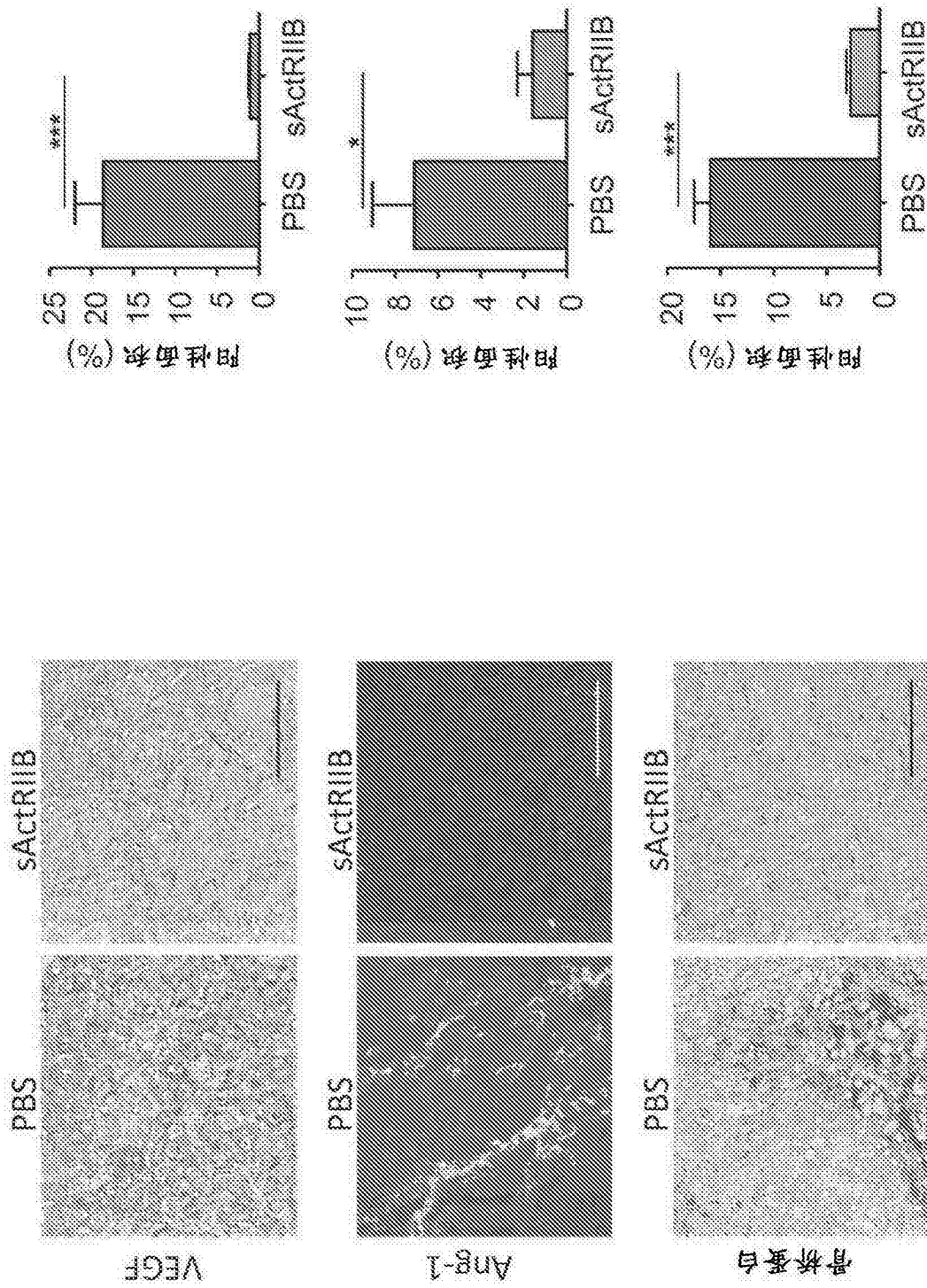


图 15A

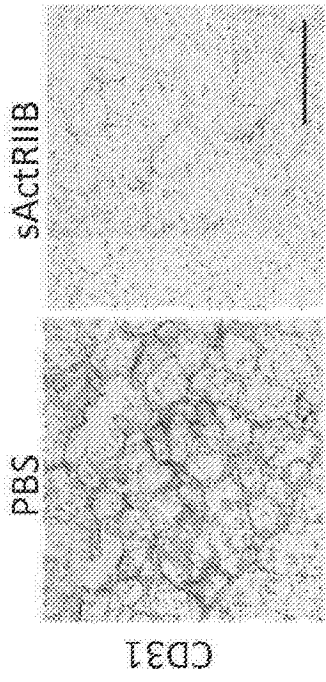
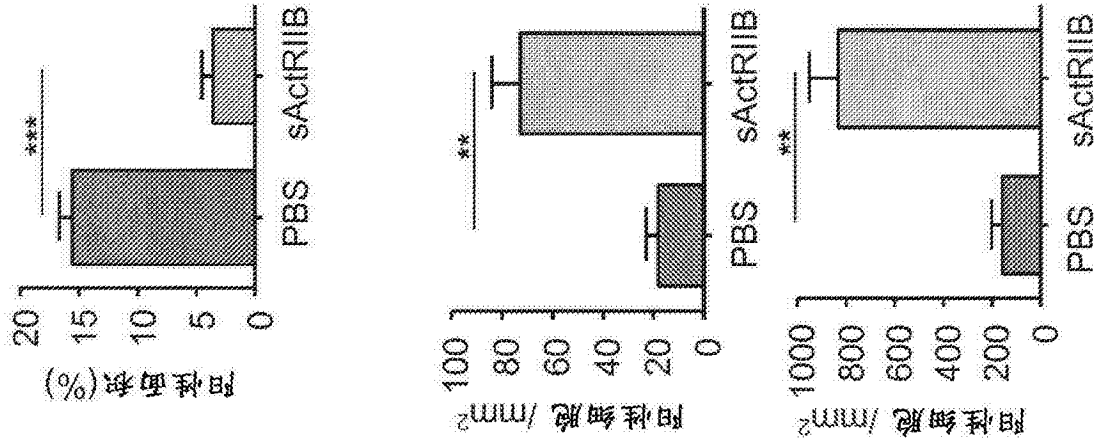


图 15B

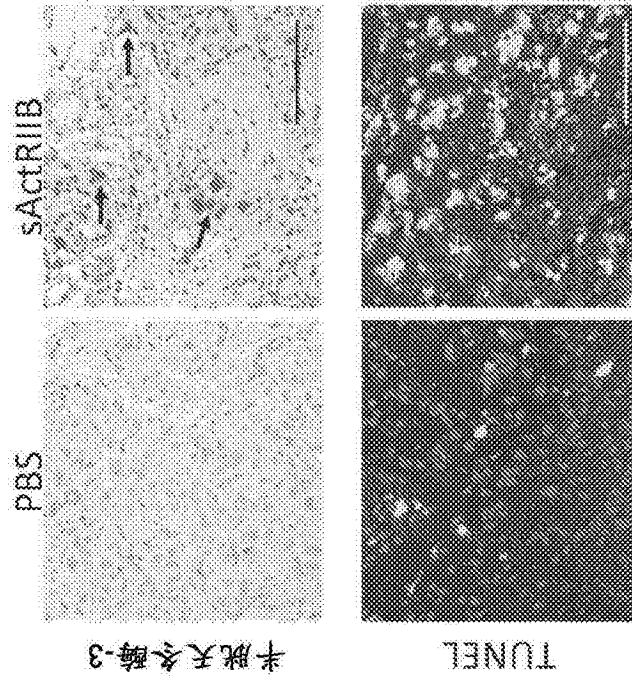


图 15C

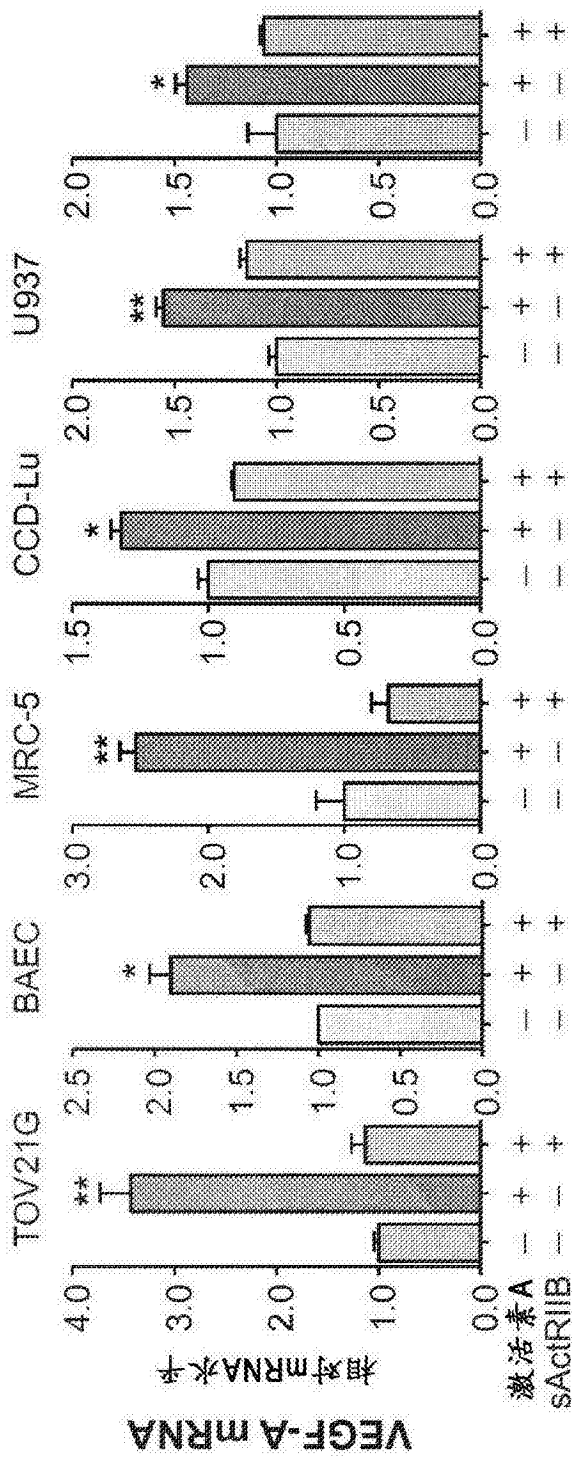


图 16A

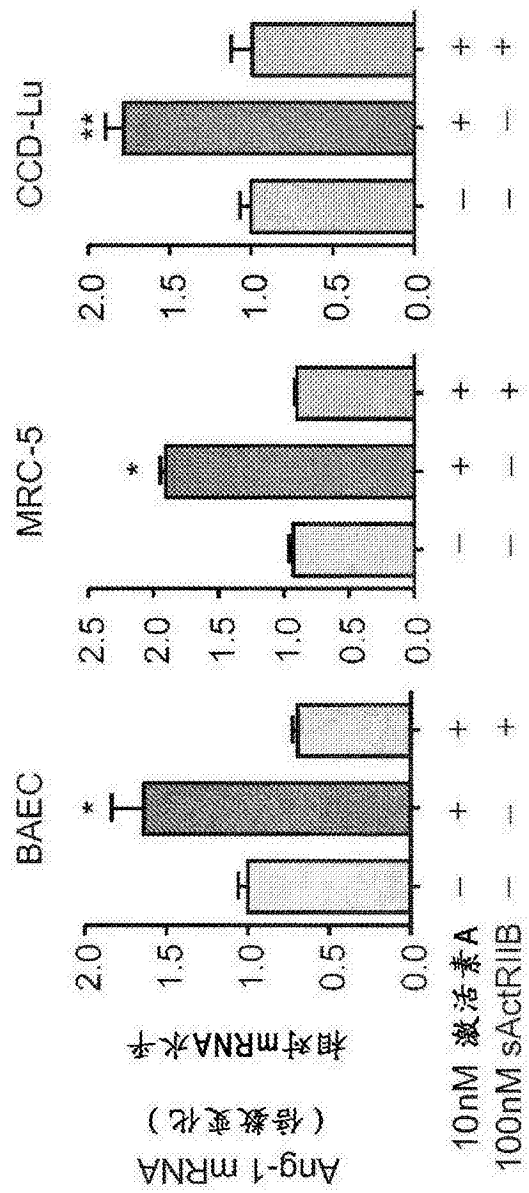


图 16B

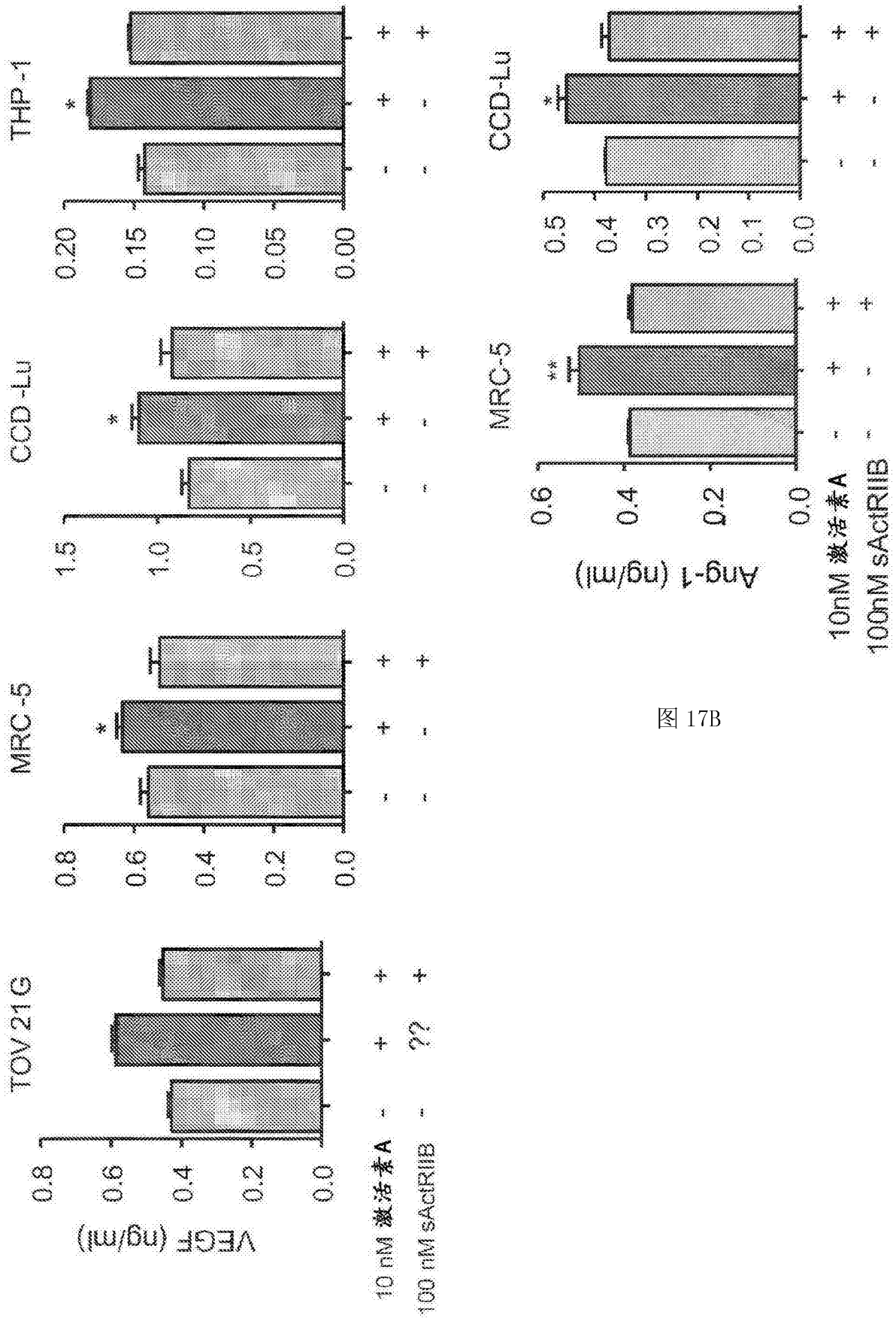


图 17B

图 17A

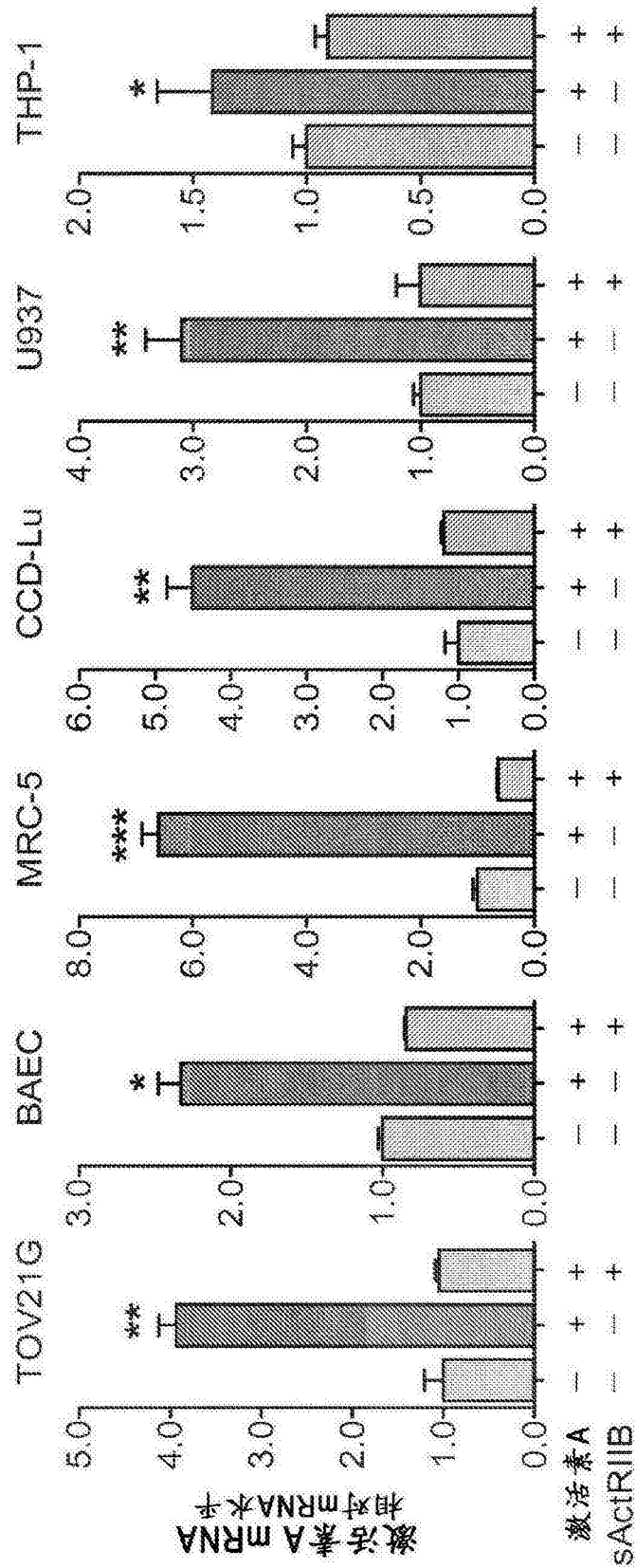


图 18

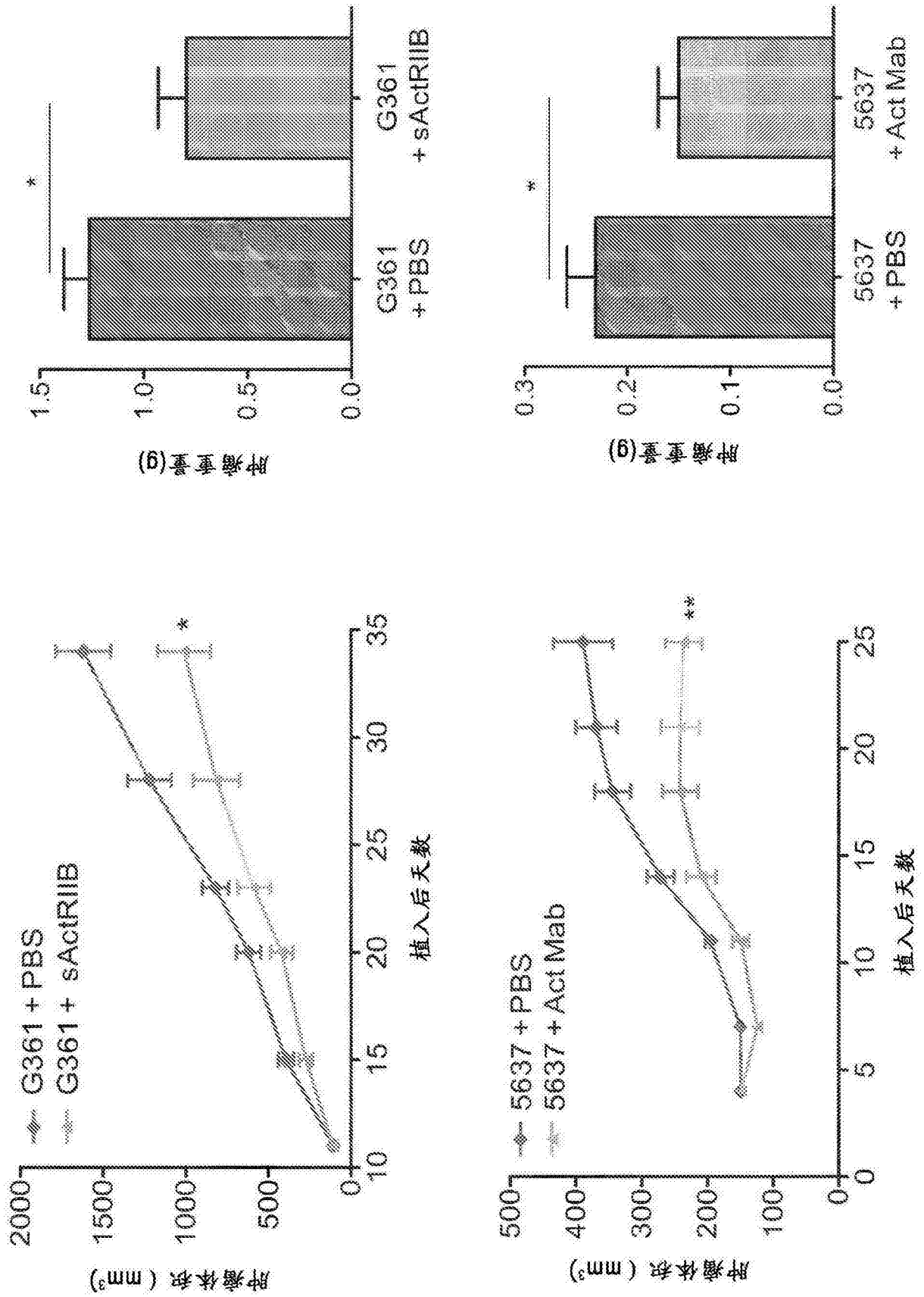
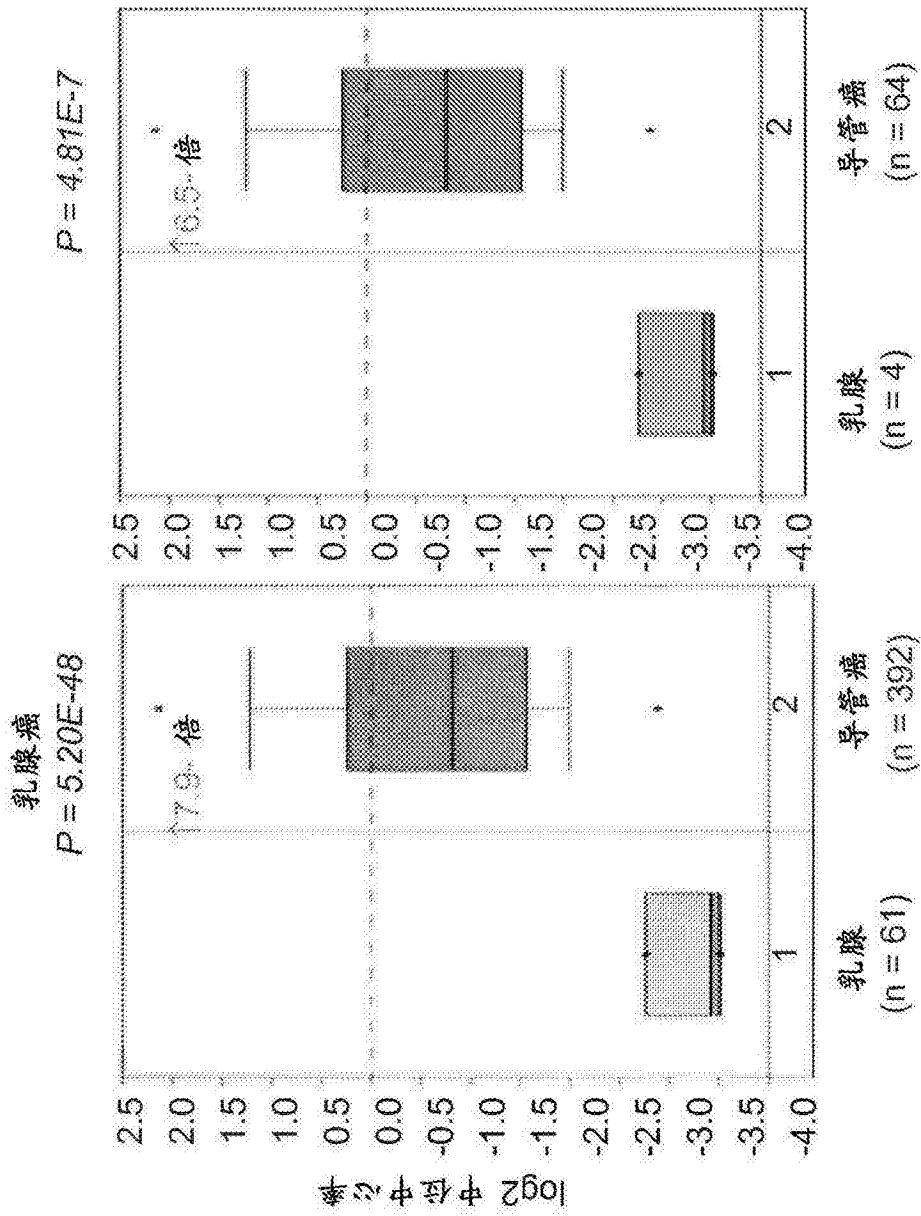


图 19



癌症基因组图谱  
Sorlie 等  
(2001)

图 20

胃癌

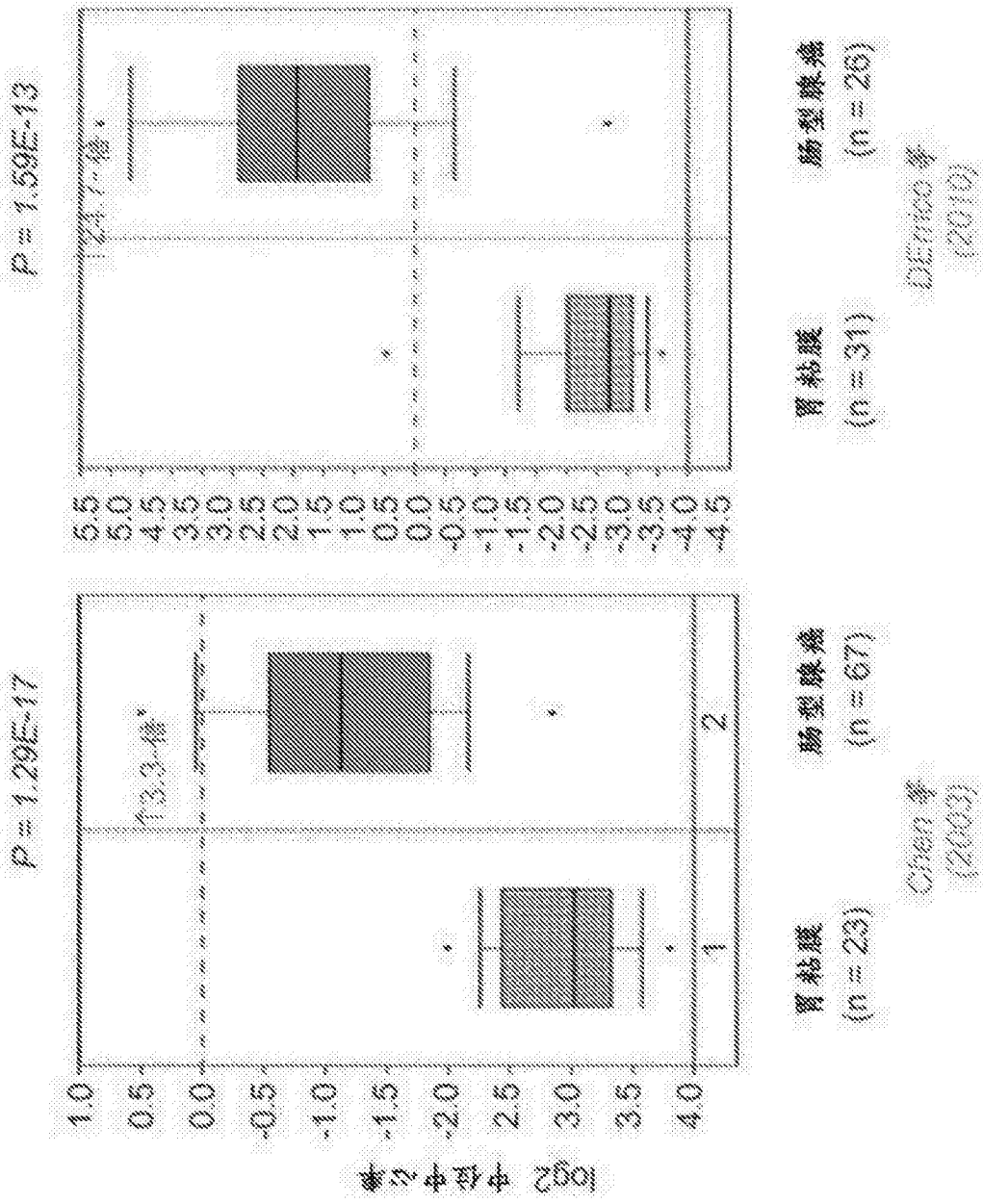


图 20(续)



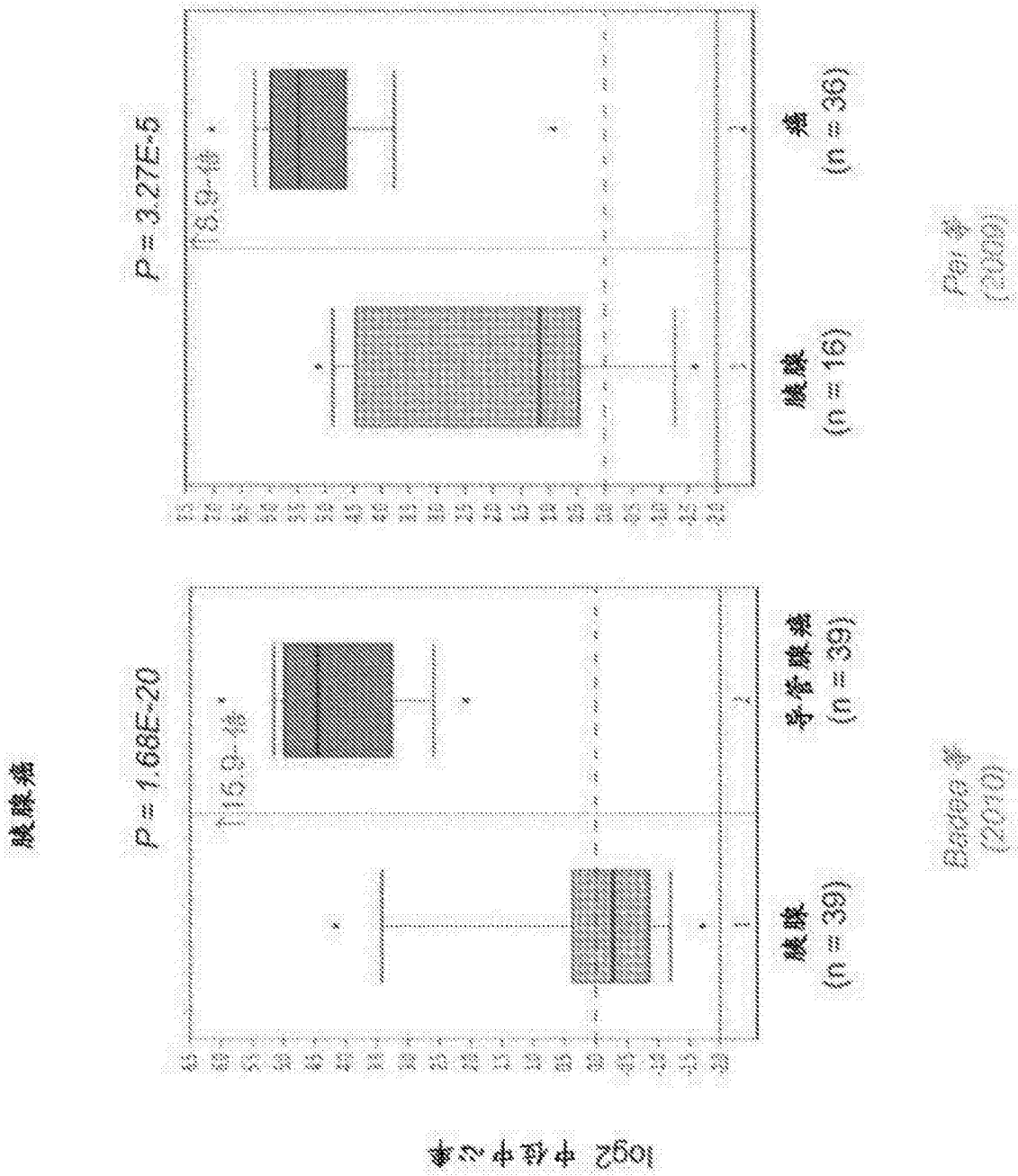
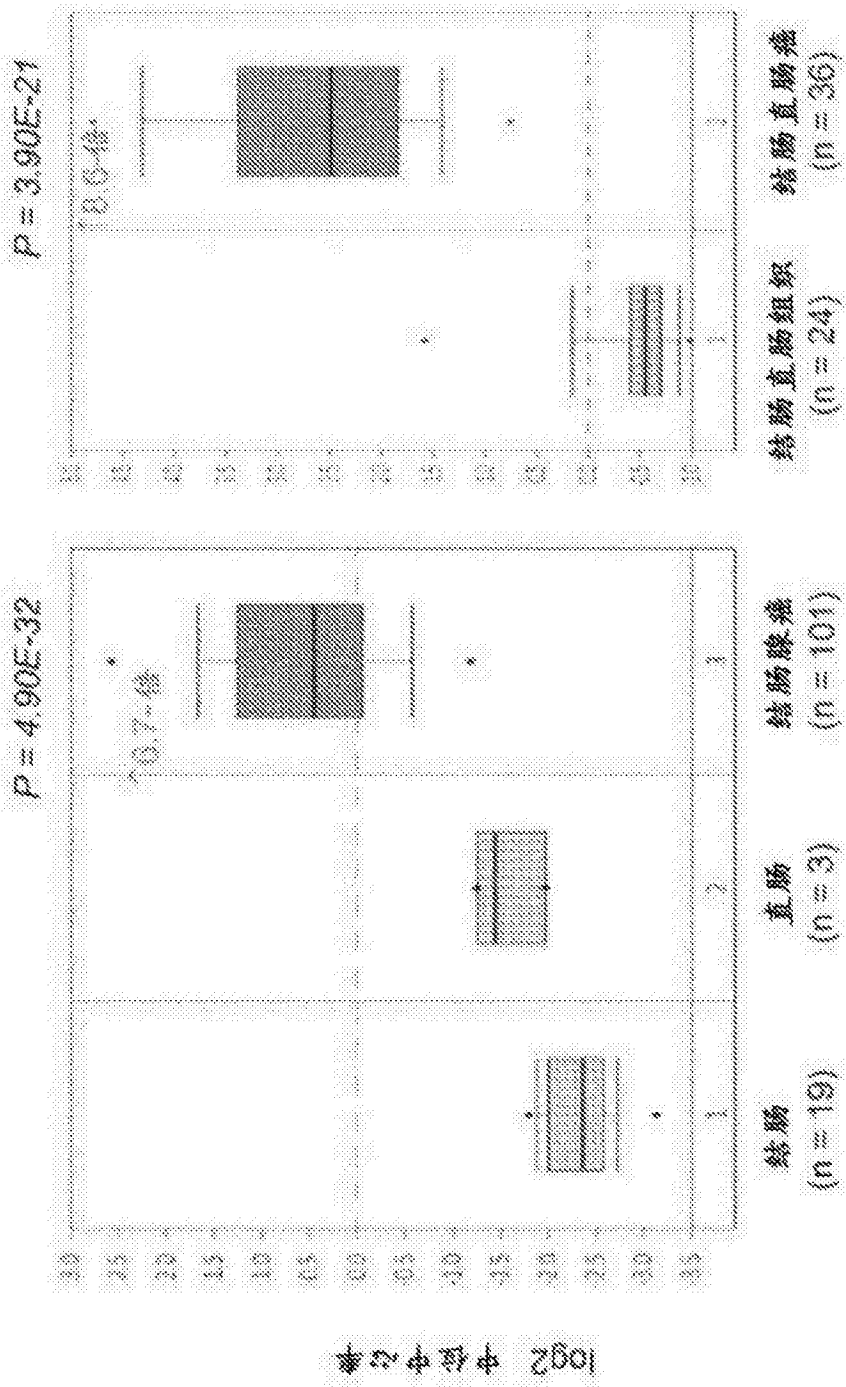


图 20(续)

结肠直肠癌



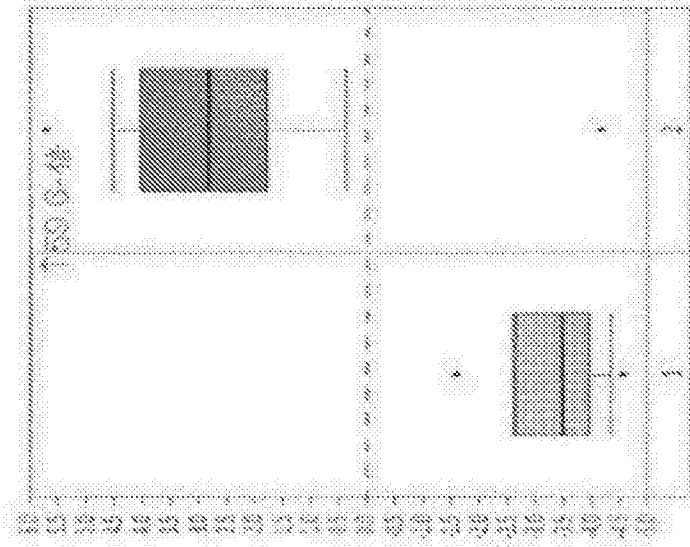
Skrypczak 等 (2010)

癌症基因组图谱 (2011)

图 20(续)

头痛

$P = 4.33E-20$

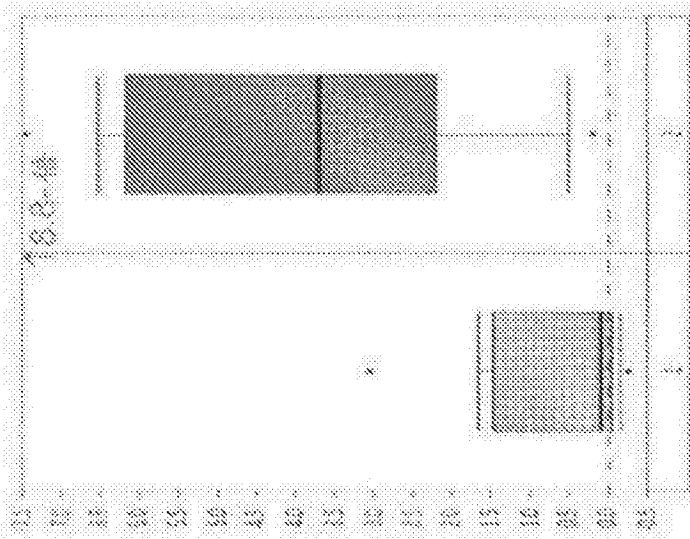


口腔粘膜  
(n = 13)

鳞状细胞癌  
(n = 41)

Ginos 等  
(2004)

$P = 2.06E-7$



舌  
(n = 12)

鳞状细胞癌  
(n = 26)

Yo 等  
(2008)

log2 中位中心率

图 20(续)

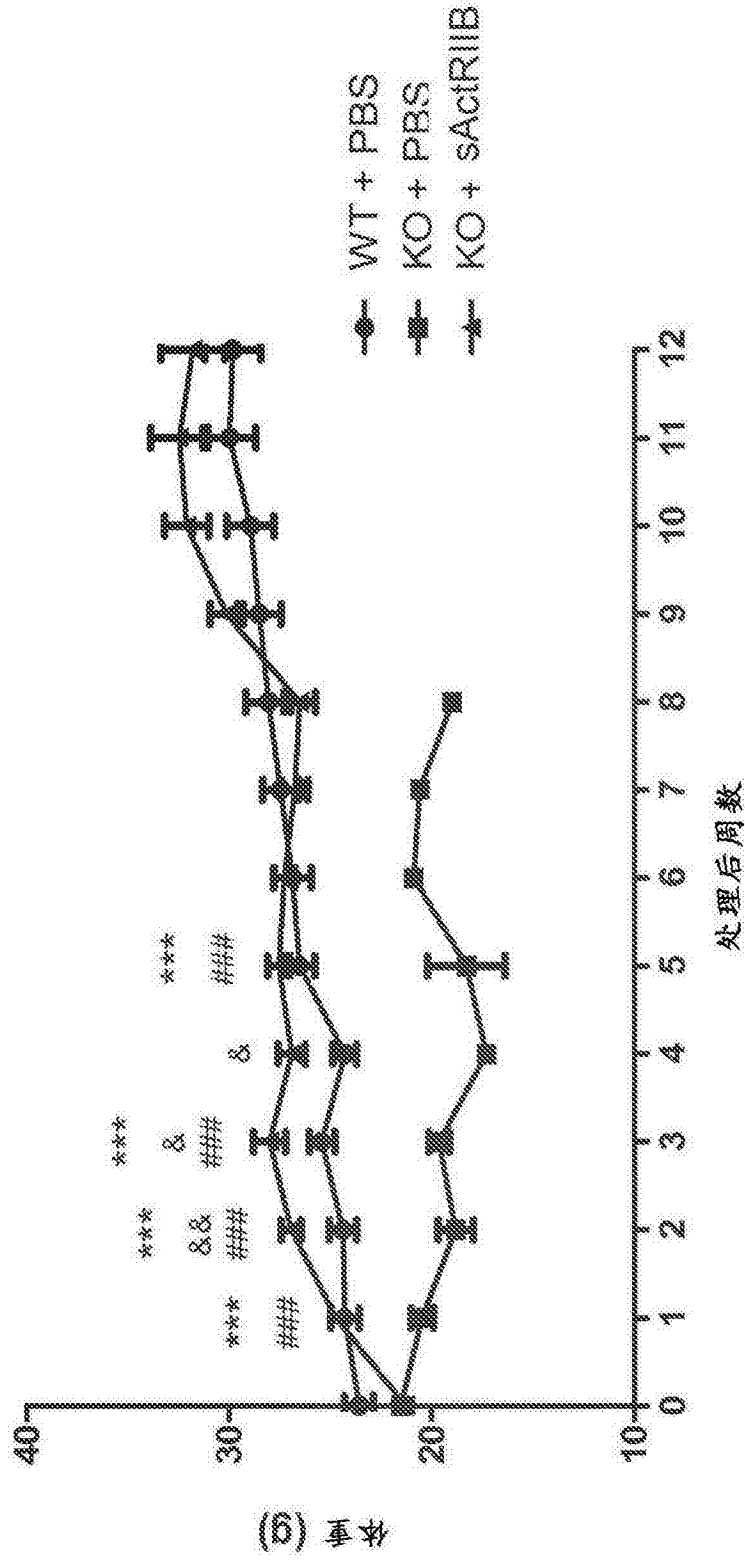


图 21

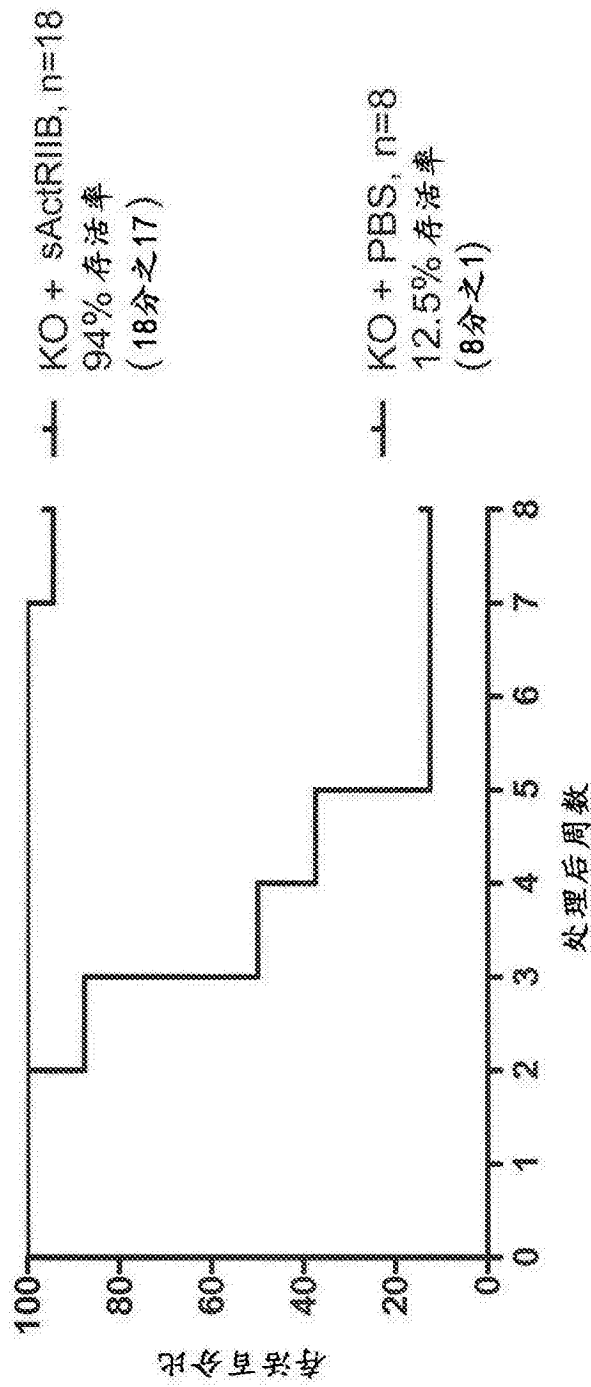


图 22

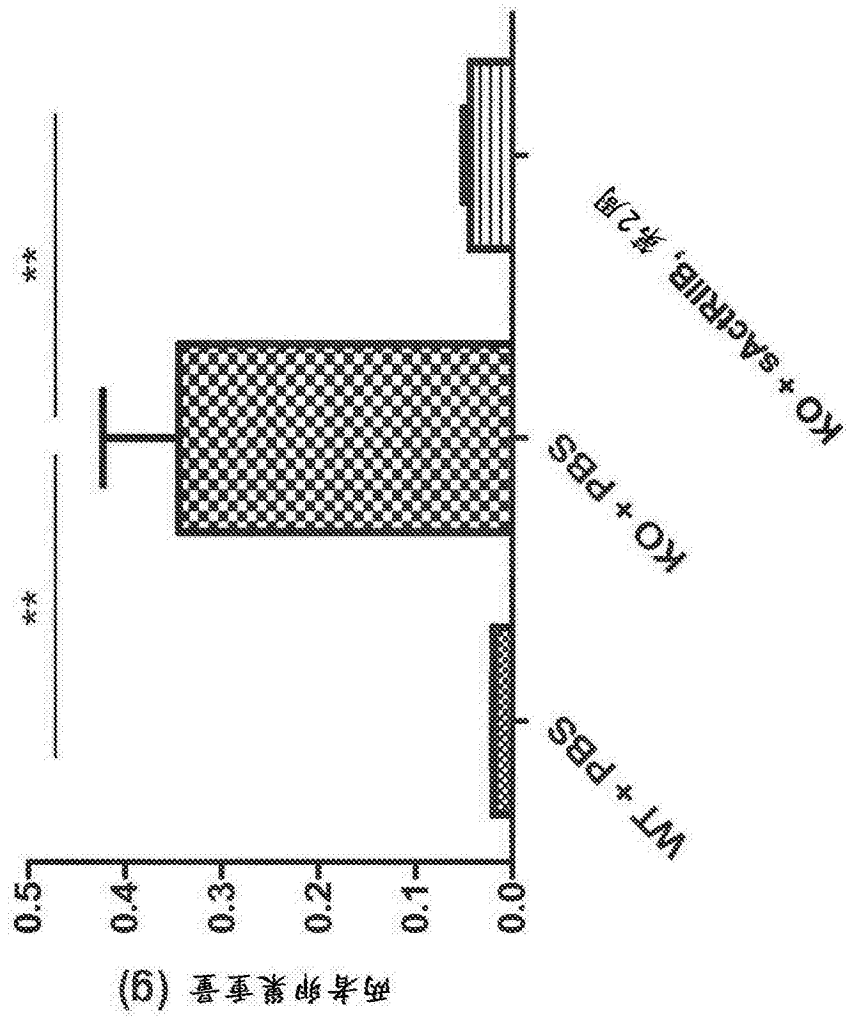


图 23

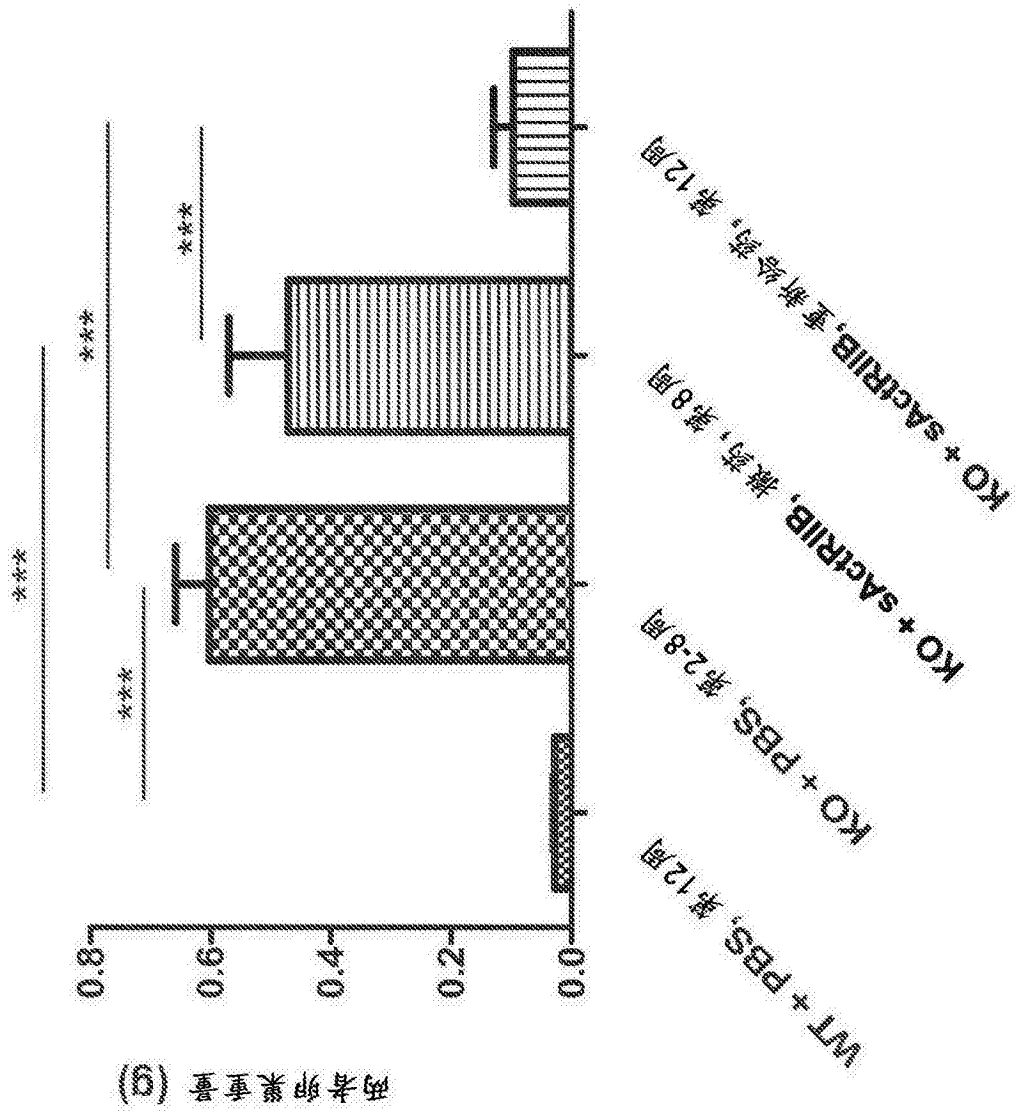


图 24

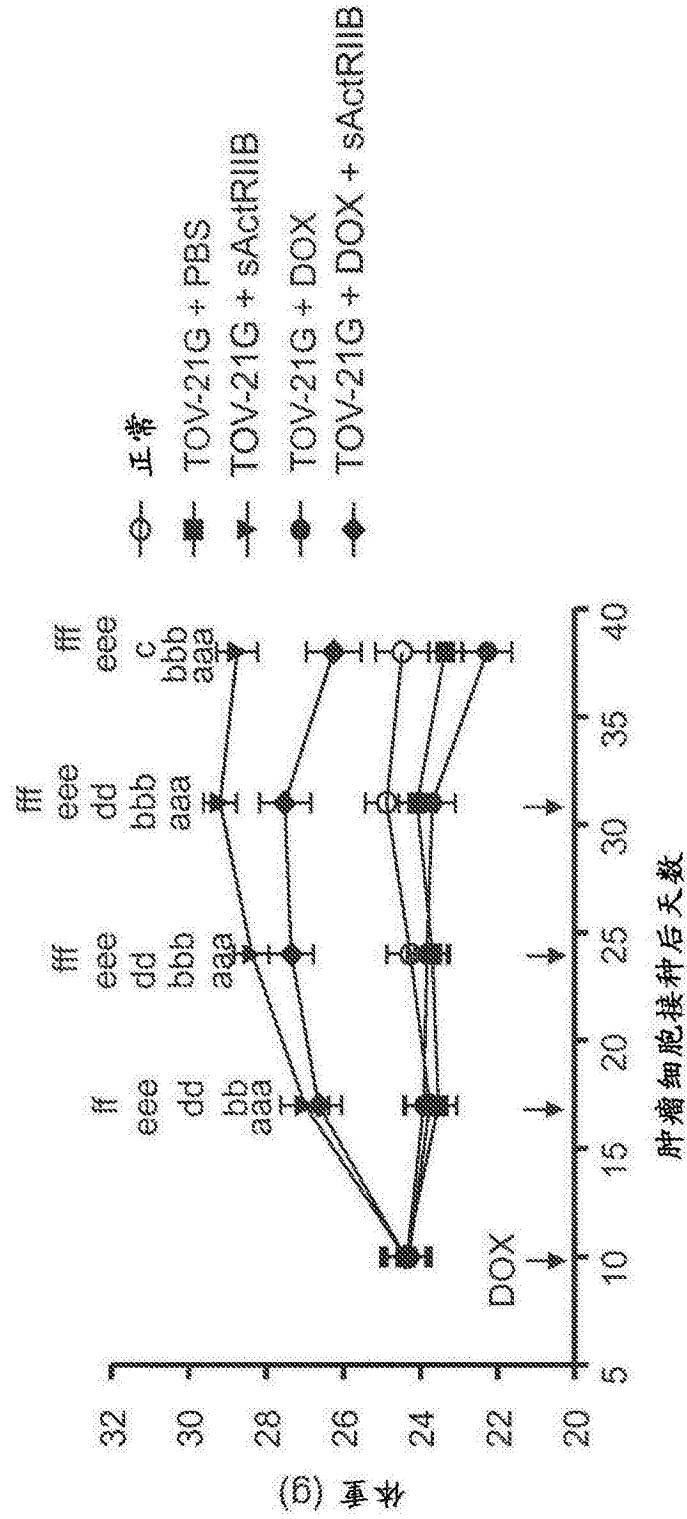


图 25



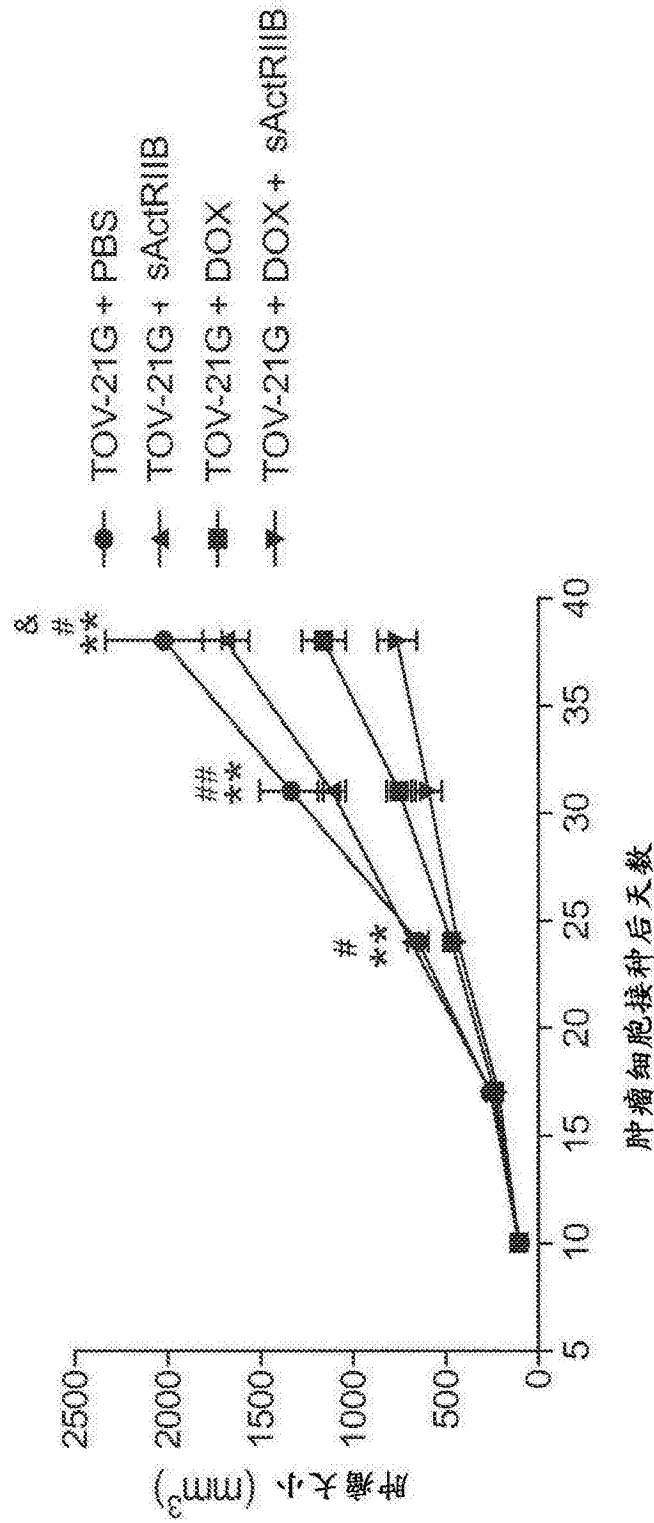


图 26

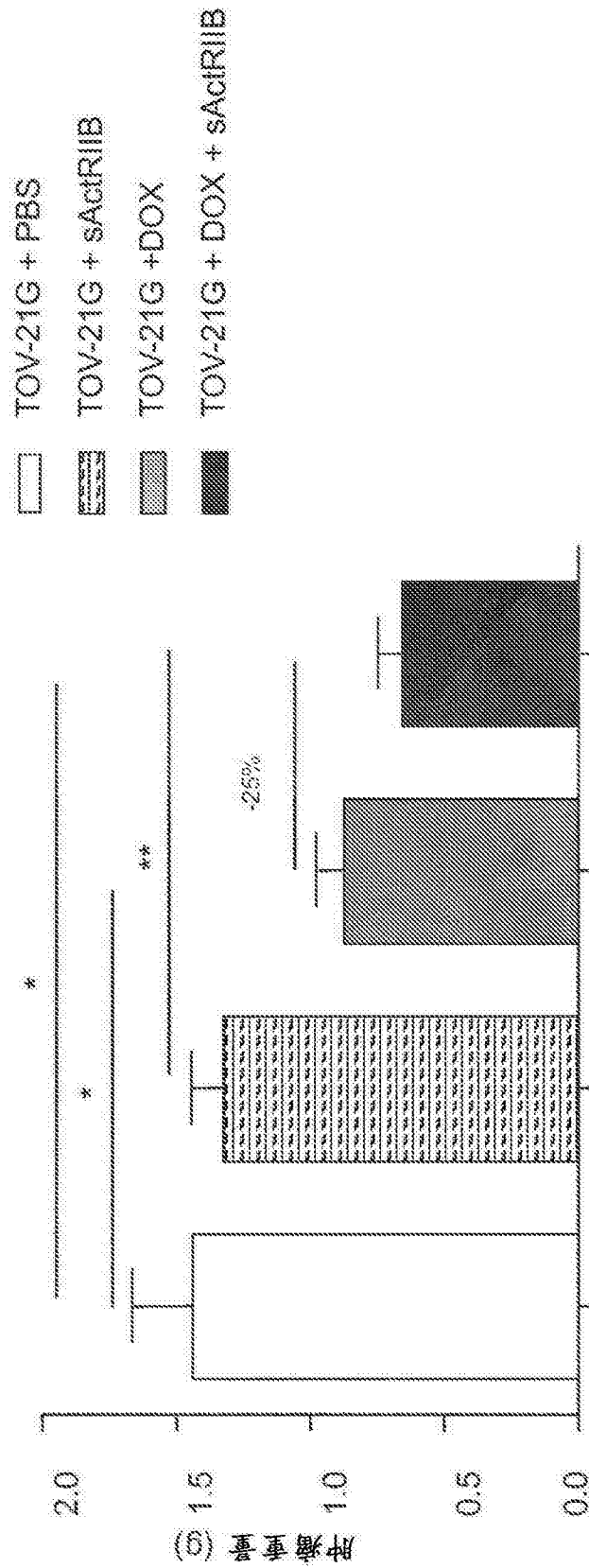


图 26(续)

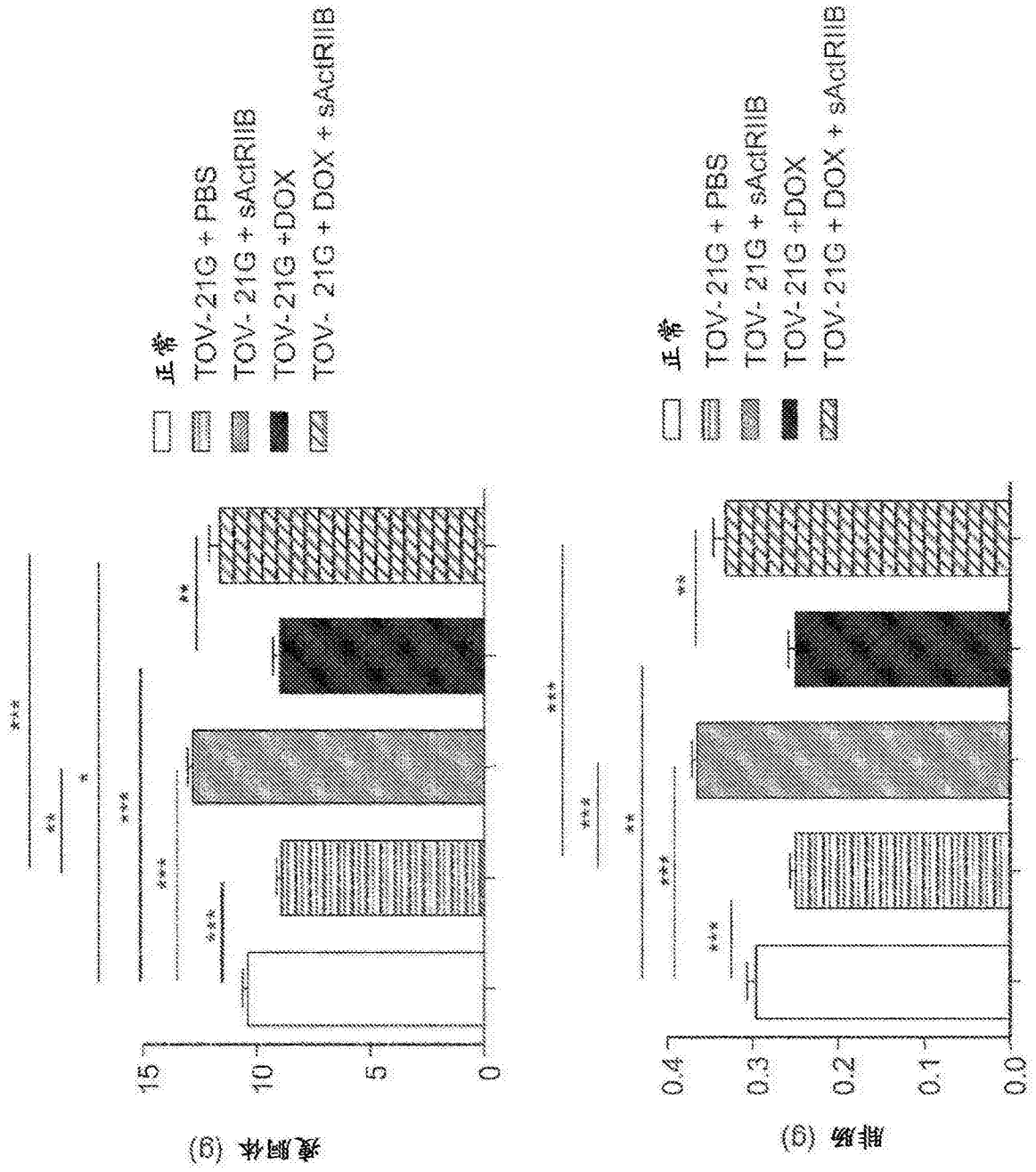


图 27

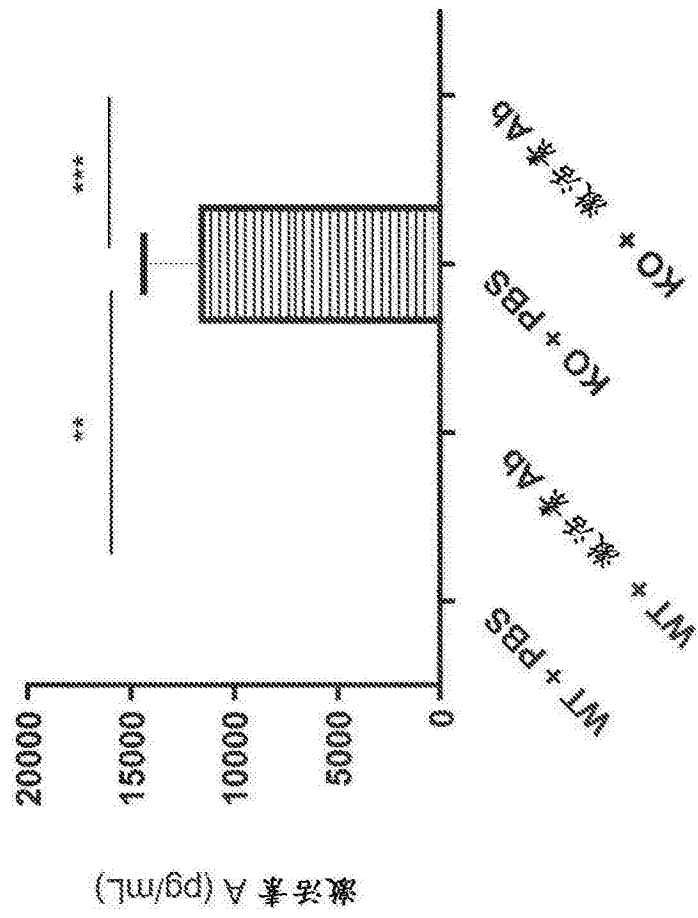


图 28

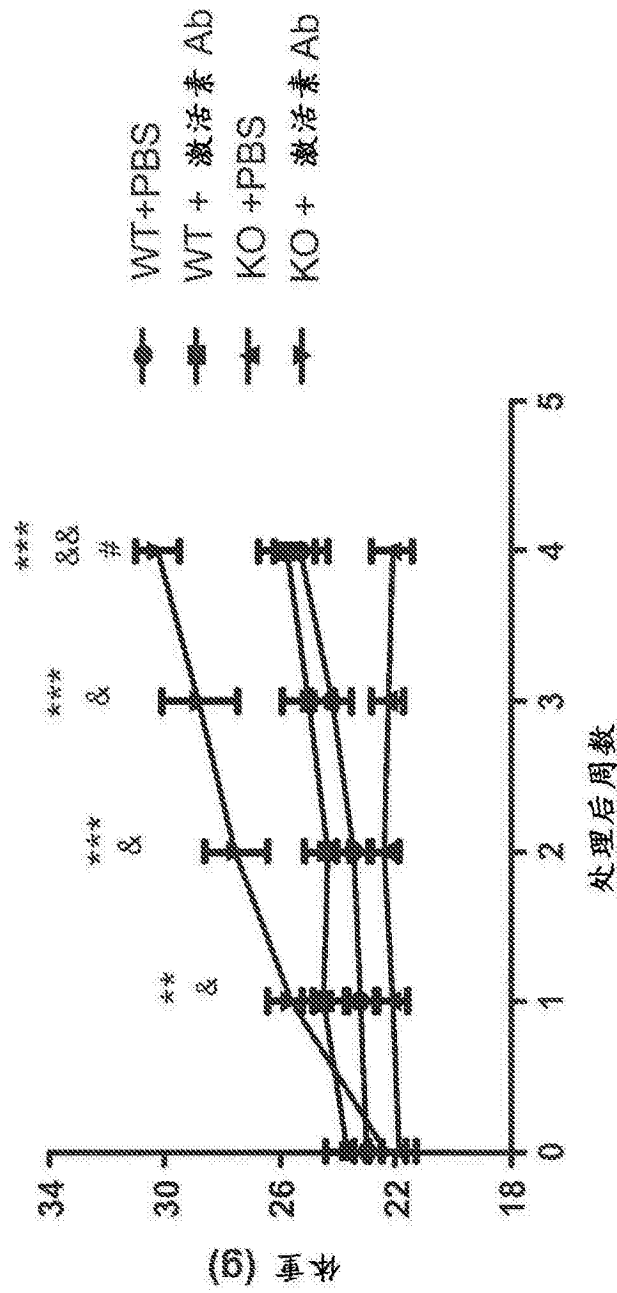


图 29

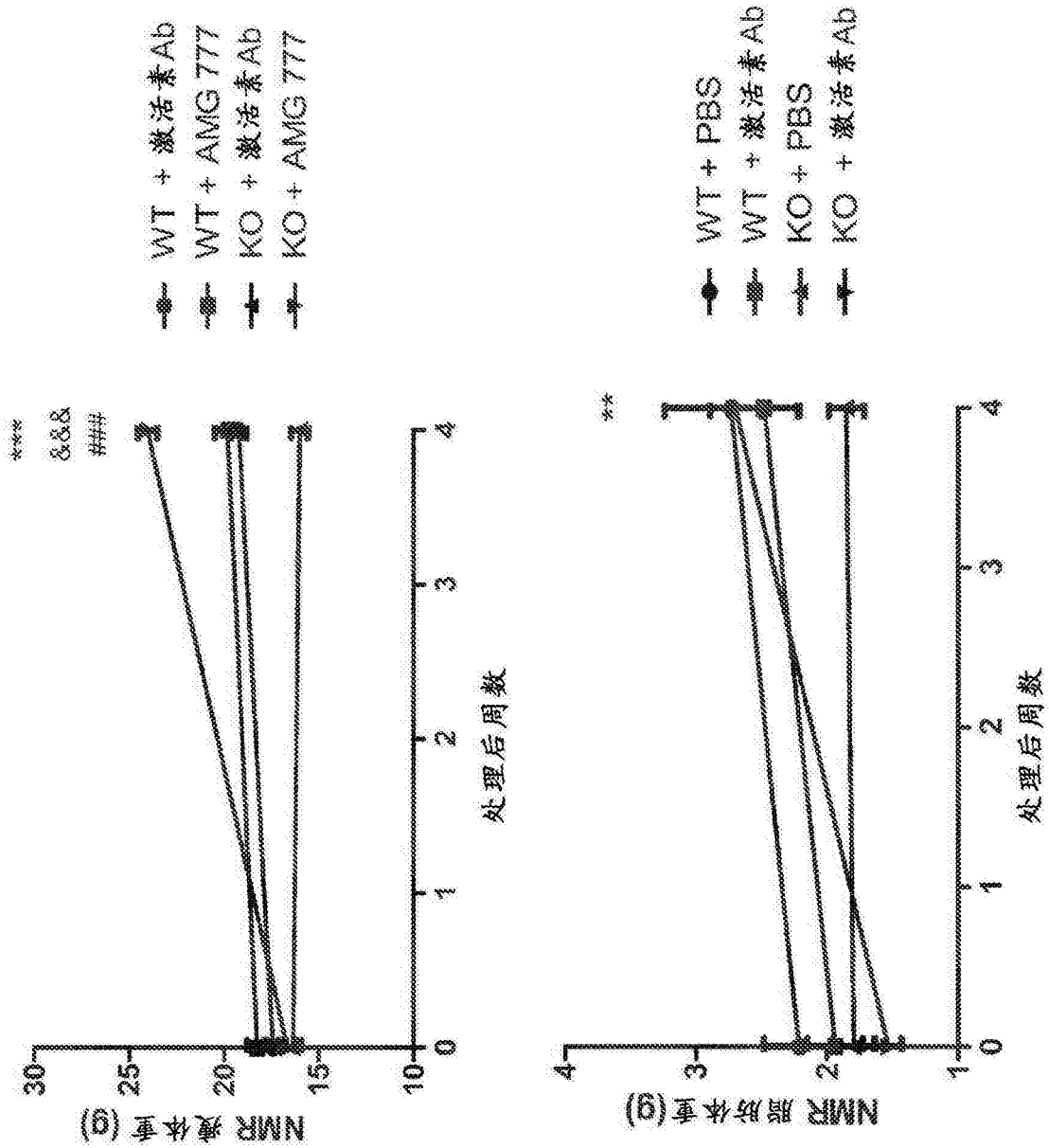


图 30

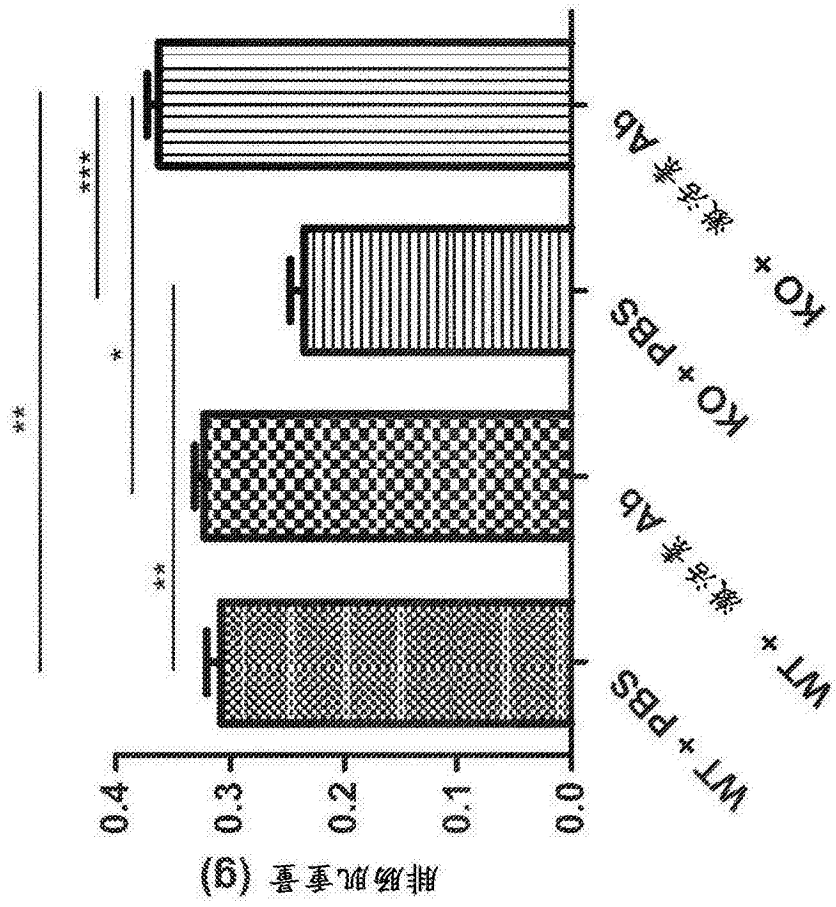


图 31

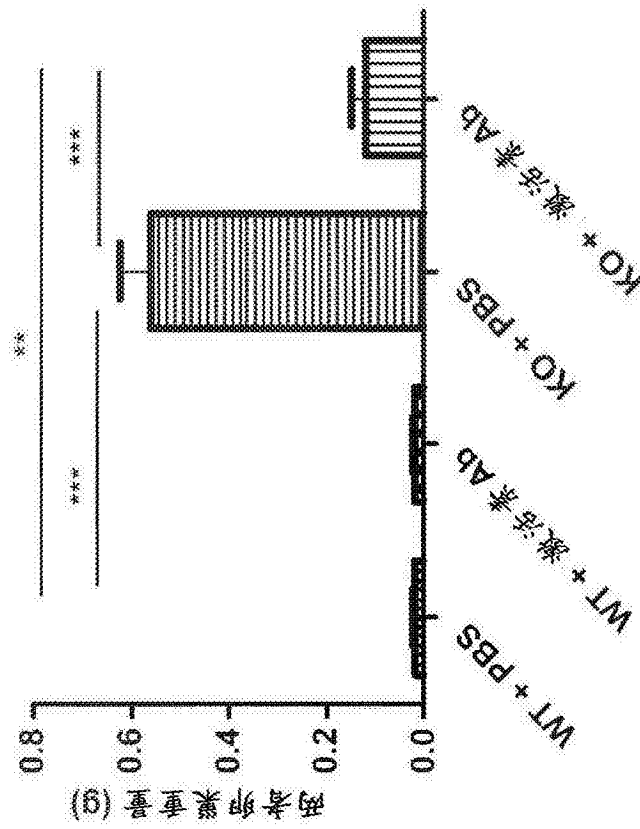


图 32A



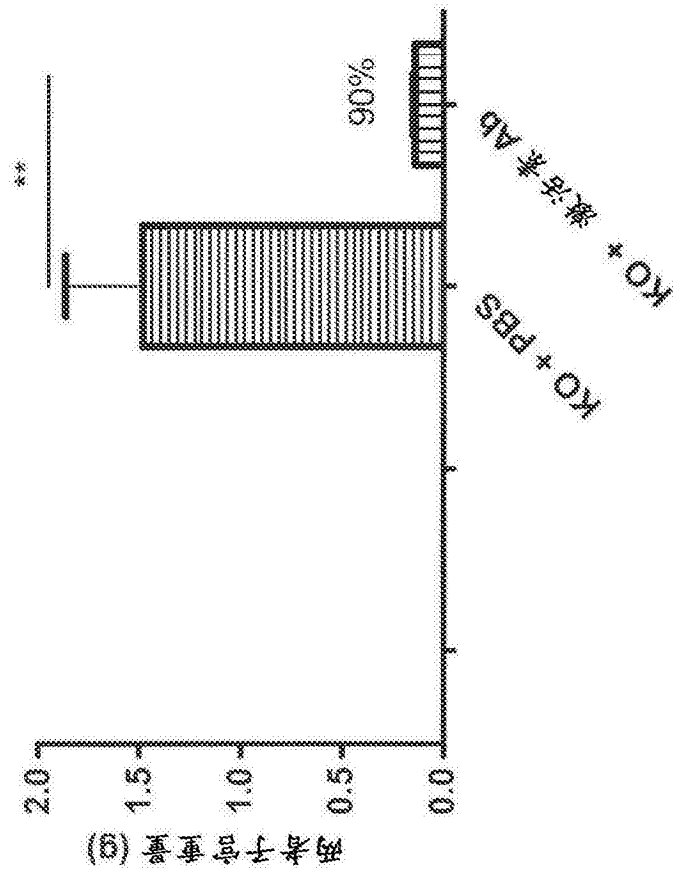


图 32B

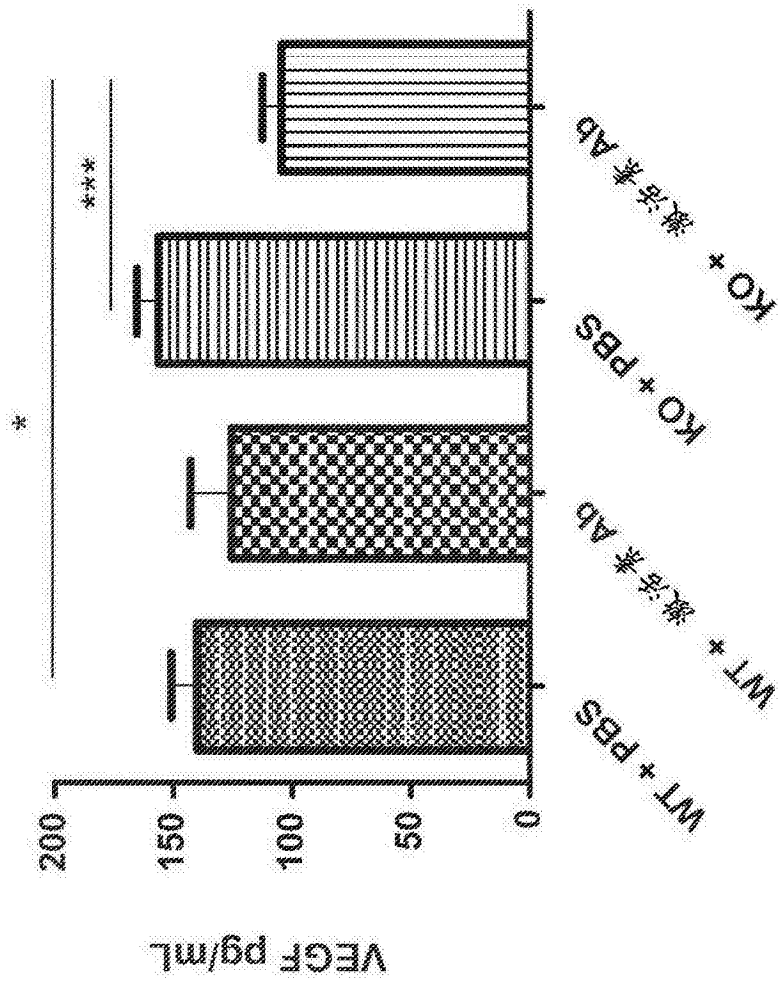


图 33

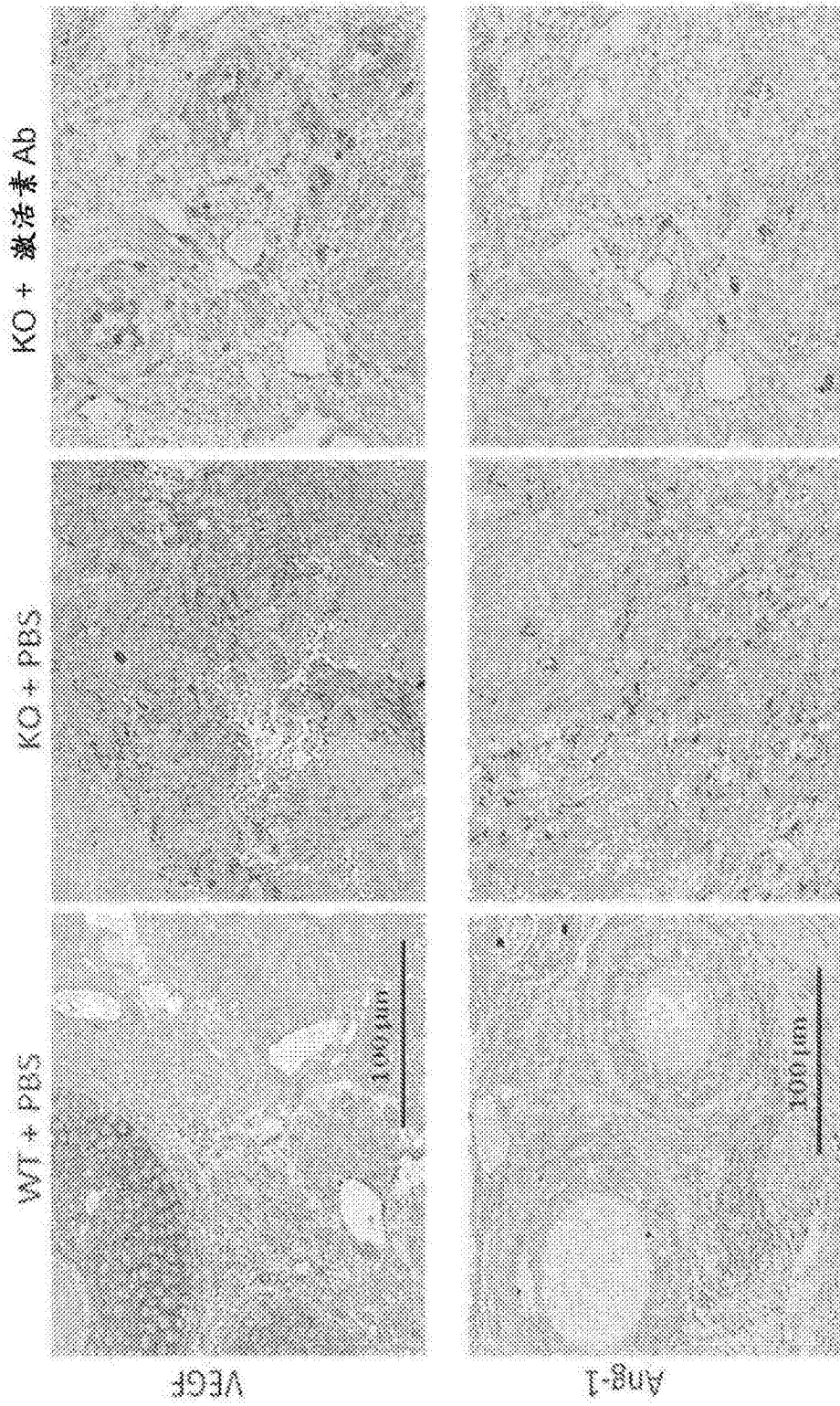


图 34

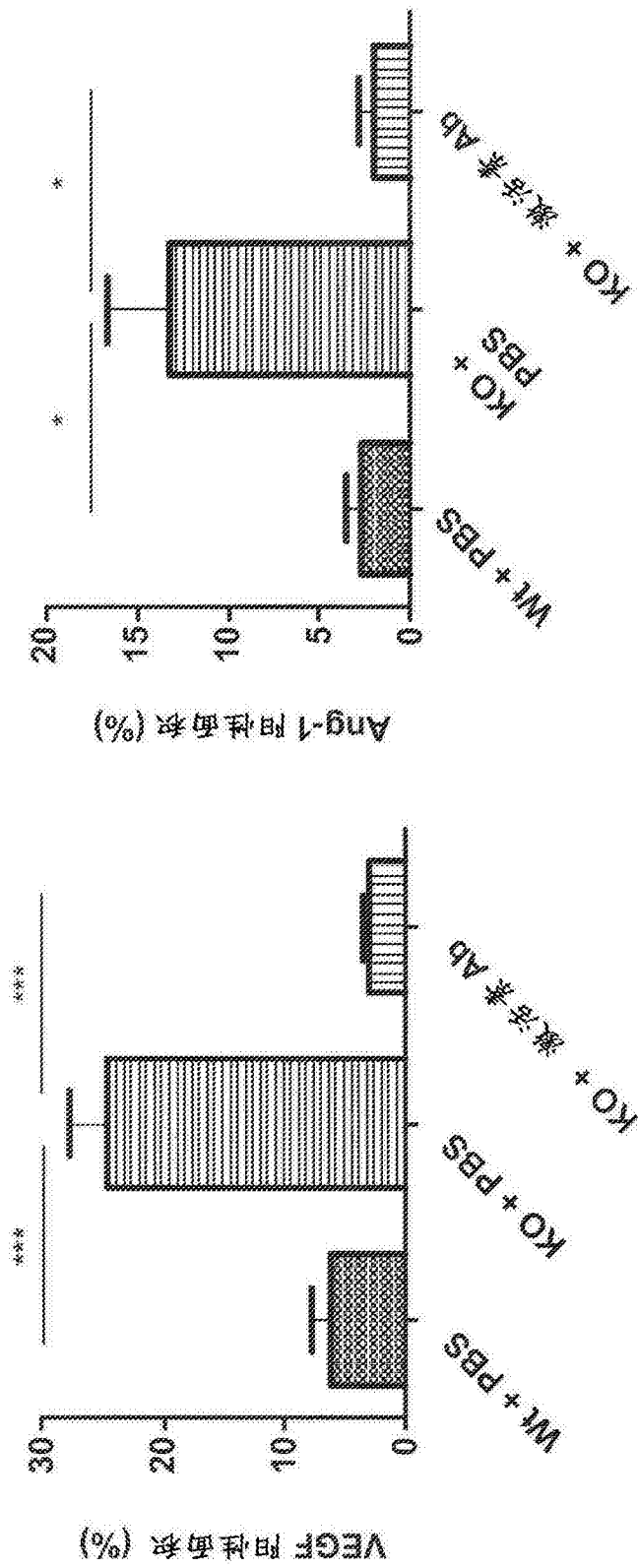


图 34(续)

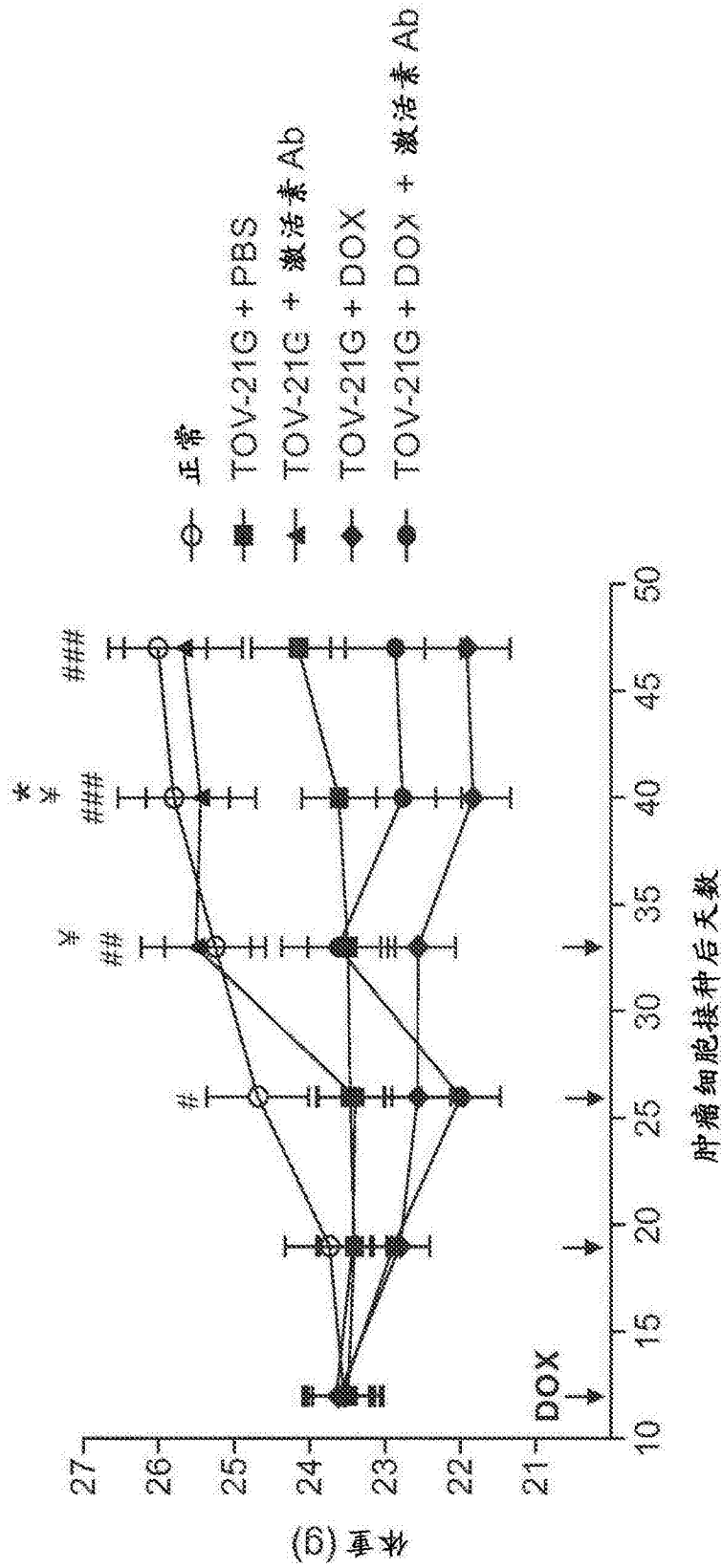


图 35

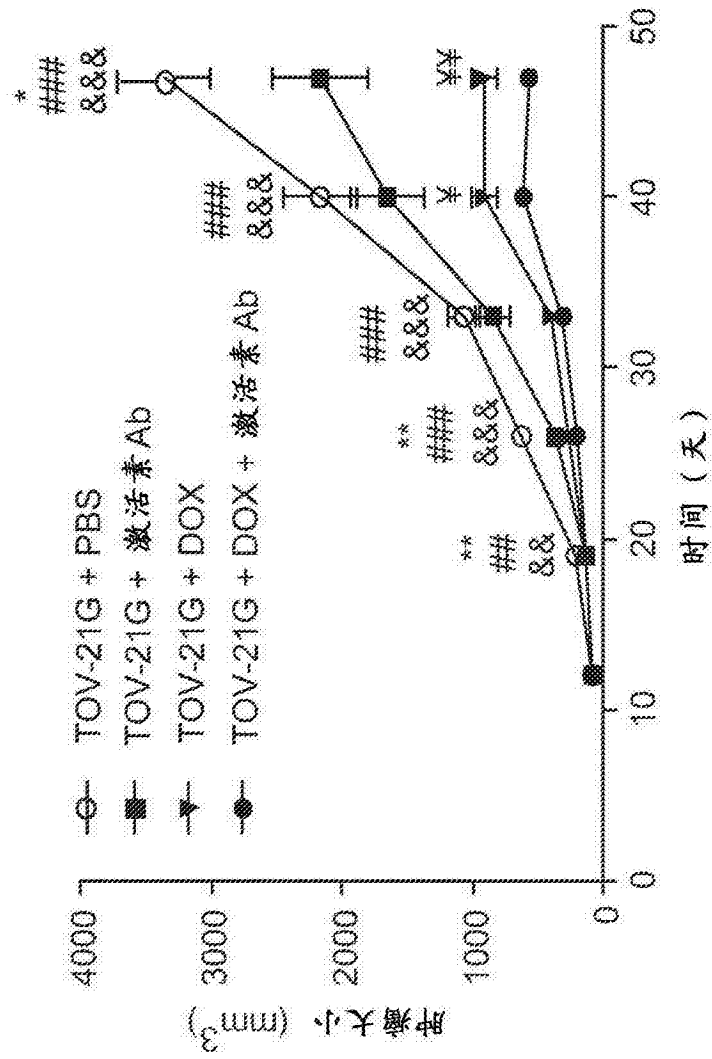


图 36

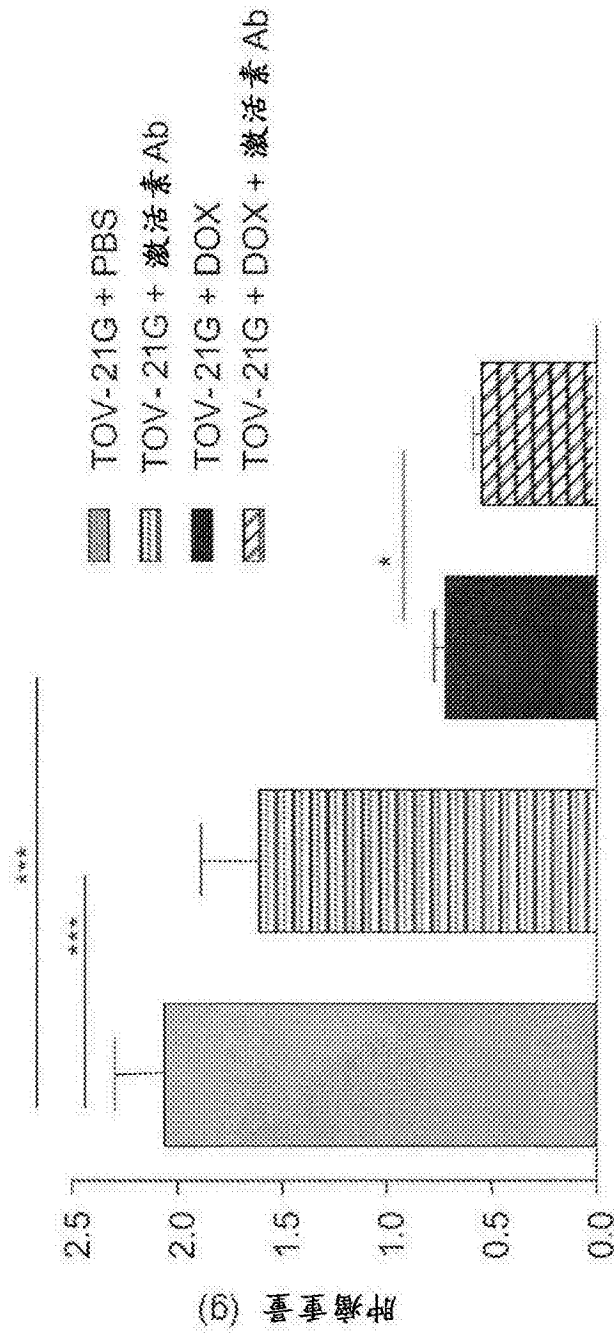


图 37

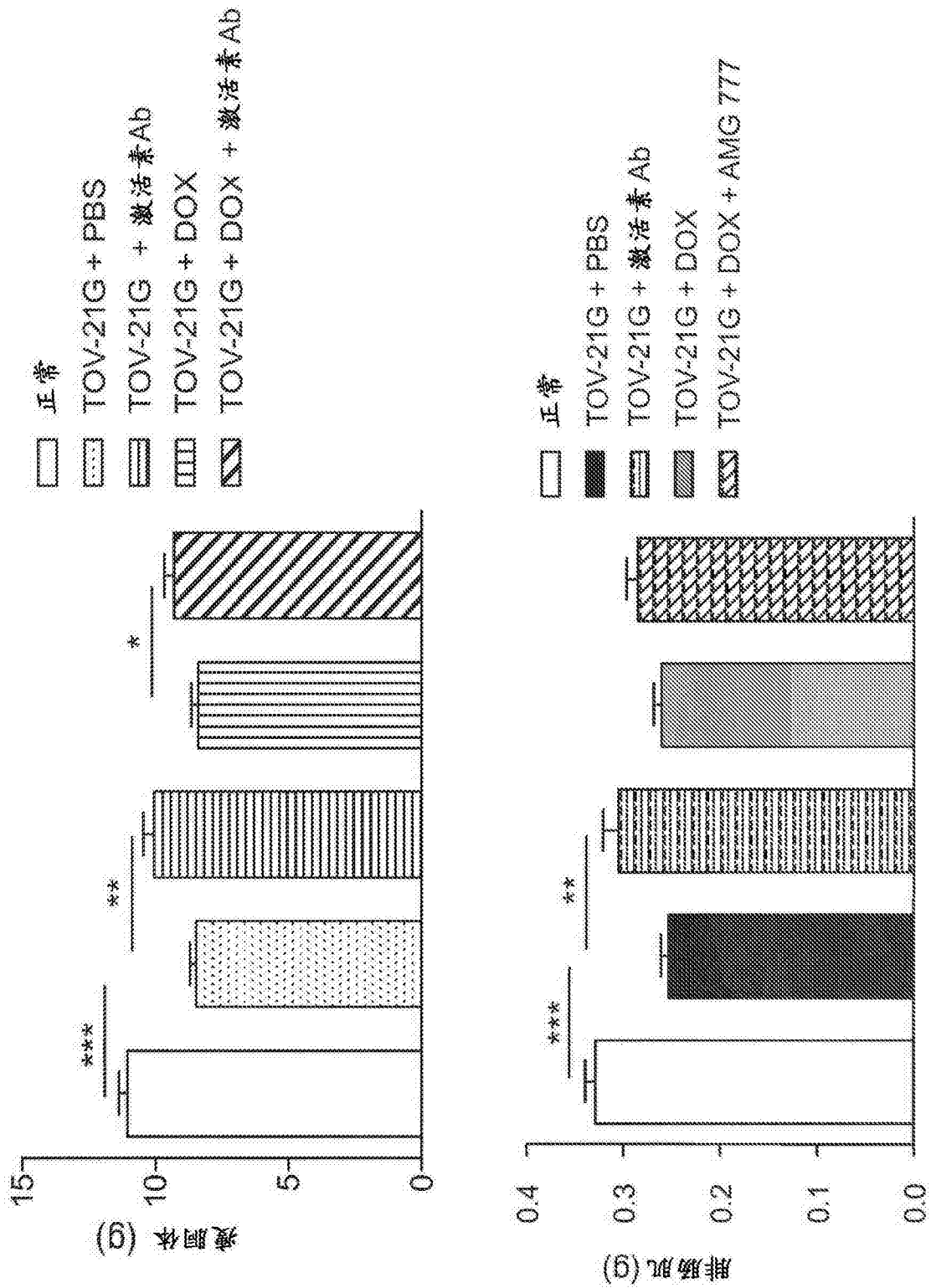


图 38