



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103298832 A

(43) 申请公布日 2013.09.11

(21) 申请号 201180064235.1

C07K 16/28 (2006.01)

(22) 申请日 2011.11.08

(30) 优先权数据

61/411,396 2010.11.08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013.07.05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/059818 2011.11.08

(87) PCT申请的公布数据

W02012/064771 EN 2012.05.18

(71) 申请人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 E. 马丁内斯-黑克特 J. 西拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 梁谋

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书3页 说明书39页 附图10页

(54) 发明名称

ACTRIIA 结合剂及其用途

(57) 摘要

除了其它方面以外,本公开内容提供了结合 ActRIIA 的中和抗体及其部分以及它们的用途。

1. 一种分离的抗体或其片段,其抑制激活素 A 与人 ActRIIA 的结合。
2. 根据权利要求 1 的分离的抗体或其片段,该抗体或其片段结合人 ActRIIa 并交叉阻断 Ab-14E1 与人 ActRIIA 的结合。
3. 一种分离的抗体或其片段,其抑制激活素 A 和激活素 B 与人 ActRIIA 的结合。
4. 根据权利要求 1-3 中的任一项的抗体或其片段,其中所述抗 -ActRIIA 抗体或片段具有选自下述的活性:(a) 降低体内促卵泡激素水平,和 (b) 抑制体外细胞系中的激活素 A 信号传递。
5. 根据权利要求 1-4 中的任一项的抗体或其片段,其中所述抗 -ActRIIA 抗体或片段具有选自下述的活性:(a) 降低切除卵巢的雌性 C57BL/6 小鼠中的促卵泡激素水平,和 (b) 抑制暴露于激活素 A 的 A204 细胞系中的 CAGA12 调节的报道基因的表达。
6. 根据权利要求 1-5 中的任一项的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段接触人 ActRIIA 的细胞外结构域中的一个或多个氨基酸,该氨基酸选自:
 - a. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 13 处的苯丙氨酸,
 - b. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 14 处的苯丙氨酸,
 - c. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 15 处的天冬酰胺,
 - d. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 17 处的天冬酰胺,
 - e. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 21 处的天冬氨酸,
 - f. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 22 处的精氨酸,
 - g. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 23 处的苏氨酸,
 - h. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 29 处的谷氨酸,
 - i. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 30 处的脯氨酸,
 - j. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 31 处的半胱氨酸,
 - k. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 32 处的酪氨酸,
 - l. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 33 处的甘氨酸,
 - m. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 34 处的天冬氨酸,
 - n. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 36 处的天冬氨酸,
 - o. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 37 处的赖氨酸,
 - p. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 39 处的精氨酸,
 - q. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 40 处的组氨酸,
 - r. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 42 处的苯丙氨酸,
 - s. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 44 处的苏氨酸,
 - t. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 46 处的赖氨酸,
 - u. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 55 处的缬氨酸,
 - v. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 56 处的赖氨酸,
 - w. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 57 处的谷氨酰胺,
 - x. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 58 处的甘氨酸,
 - y. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 59 处的半胱氨酸,
 - z. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 60 处的色氨酸,
 - aa. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 61 处的亮氨酸,

- bb. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 62 处的天冬氨酸,
- cc. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 63 处的天冬氨酸,
- dd. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 64 处的异亮氨酸,
- ee. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 65 处的天冬酰胺,
- ff. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 66 处的半胱氨酸,
- gg. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 76 处的赖氨酸,
- hh. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 80 处的谷氨酸,
- ii. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 81 处的缬氨酸,
- jj. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 83 处的苯丙氨酸, 和
- kk. 在 SEQ ID NO: 16 的位置 85 处的半胱氨酸。

7. 根据权利要求 1-6 中的任一项的分离的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段包含一个或多个氨基酸, 该氨基酸选自由下述氨基酸组成的 VH 残基集合:

- a. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 -20 处的缬氨酸,
- b. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +4 处的甘氨酸,
- c. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +5 处的酪氨酸,
- d. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +9 处的丝氨酸,
- e. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +10 处的甘氨酸,
- f. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +11 处的酪氨酸,
- g. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +12 处的酪氨酸,
- h. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +32 处的酪氨酸,
- i. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +37 处的天冬酰胺,
- j. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +4 处的丙氨酸,
- k. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +5 处的酪氨酸,
- l. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +6 处的精氨酸,
- m. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +7 处的天冬酰胺,
- n. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +8 处的天冬氨酸,
- o. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +10 处的精氨酸,
- p. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +12 处的丙氨酸,
- q. 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +13 处的酪氨酸; 和
- r. 前述任一个的保守置换。

8. 根据权利要求 1-7 中的任一项的分离的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段包含一个或多个氨基酸, 该氨基酸选自由下述氨基酸组成的 VL 残基集合:

- a. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +5 处的天冬氨酸,
- b. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +7 处的丝氨酸,
- c. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +9 处的天冬酰胺,
- d. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +10 处的苯丙氨酸,
- e. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +27 处的酪氨酸,
- f. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +28 处的苯丙氨酸,
- g. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +30 处的丝氨酸,

- h. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起,在位置 +31 处的精氨酸,
- i. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起,在位置 +32 处的亮氨酸,
- j. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起,在位置 +34 处的丝氨酸,
- k. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起,在位置 -21 处的丝氨酸,
- l. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起,在位置 +3 处的甘氨酸,
- m. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起,在位置 +4 处的天冬酰胺,
- n. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起,在位置 +5 处的苏氨酸,
- o. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起,在位置 +6 处的亮氨酸,
- p. 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起,在位置 +8 处的色氨酸,和
- q. 前述任一个的保守置换。

9. 根据权利要求 1-8 中的任一项的抗体或其片段,该抗体或其片段包含至少一个 CDR 序列,该 CDR 序列与选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 具有至少 80% 同一性。

10. 根据权利要求 1-8 中的任一项的抗体或其片段,该抗体或其片段包含至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、或至少 6 个 CDR 序列,该 CDR 序列与选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 具有至少 80% 同一性。

11. 根据权利要求 1-8 中的任一项的抗体或其片段,该抗体或其片段包含 3 个 CDR: CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3,其中 CDR-H1 包含与 SEQ ID NO: 4 具有至少 80% 同一性的序列, CDR-H2 包含与 SEQ ID NO: 5 具有至少 80% 同一性的序列,且 CDR-H3 包含与 SEQ ID NO: 6 具有至少 80% 同一性的序列。

12. 根据权利要求 1-8 中的任一项的抗体或其片段,该抗体或其片段包含重链,其中所述重链包含与在 SEQ ID NO: 12 中给出的序列具有至少 80% 同一性的多肽。

13. 根据权利要求 1-8 中的任一项的抗体或其片段,该抗体或其片段包含轻链,其中所述轻链包含与在 SEQ ID NO: 13 中给出的序列具有至少 80% 同一性的多肽。

14. 根据权利要求 1-8 中的任一项的抗体或其片段,该抗体或其片段包含重链和轻链,其中该重链包含与在 SEQ ID NO: 12 中给出的序列具有至少 80% 同一性的多肽,且该轻链包含与在 SEQ ID NO: 13 中给出的序列具有至少 80% 同一性的多肽。

15. 一种制备 ActRIIA 结合剂的方法,该方法包括:用衍生自 ActRIIA 的抗原多肽免疫活的纯合的 ActRIIA- 缺陷型小鼠。

16. 一种治疗具有不希望的 ActRIIA 依赖性信号传递的患者中的病症的方法,方法包括:给有此需要的患者施用有效量的权利要求 1-14 中的任一项的抗体。

17. 根据权利要求 16 的方法,其中该病症的特征在于瘦体重不足。

18. 根据权利要求 16 的方法,其中该病症的特征在于肌肉量或肌肉功能的下降。

19. 根据权利要求 16 的方法,其中该病症是癌症恶病质或少肌症。

20. 根据权利要求 16 的方法,其中该患者具有不希望的高水平的促卵泡激素。

21. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 1-14 中的任一项的抗体或片段。

22. 与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体相组合的根据权利要求 1-14 中的任一项的抗体或其片段。

23. 与 Fc、聚乙二醇、白蛋白和转铁蛋白中的至少一种缀合的根据权利要求 1-14 中的任一项的抗体或其片段。

ACTRIIA 结合剂及其用途

[0001] 相关申请

本申请要求 2010 年 11 月 8 日提交的美国临时申请系列号 61/411,396 的权益。上述申请的所有教导通过引用并入本文。

[0002] 背景技术

激活素 IIA 型受体 (ActRIIA 或 ACVR2A) 是激活素蛋白以及 TGF- β 超家族的其它成员的高亲和力受体。普遍认为 ActRIIA 会转导导致一种或多种 SMAD 转录因子 (尤其是 SMAD 1、2、3 和 5) 的磷酸化的信号。ActRIIA 已经涉入广范围的生物学过程的调节,所述生物学过程包括骨形成、肌肉形成、红血细胞形成、肿瘤生长、免疫功能和生殖激素 (诸如 FSH) 的产生。

[0003] 促卵泡激素 (FSH) 由垂体前叶产生,并调节性腺功能,包括配子的产生和成熟。从垂体分泌的 FSH 受到来自脑的促性腺素释放激素 (GnRH) 与源自垂体的性激素和旁分泌效应物的协同调节。最初通过激活素的增加垂体促性腺细胞的 FSH 分泌的能力和激活素介导的信号传递 (部分地通过激活素 IIA 型受体 (ActRIIA)) 来鉴定所述激活素,现在认为激活素会通过多个调节水平的作用来促进 FSH 分泌 (Gregory 等人, 2004, *Semin Reprod Med* 22:253-267)。

[0004] **FSH** 释放对于雌性排卵和雄性精子成熟是必需的。在雌性中,FSH 刺激卵巢中卵泡颗粒细胞增殖并影响雌激素 (一种参与卵泡成熟和排卵的激素) 的合成。在雄性中,FSH 参与精细胞成熟。更具体而言,FSH 在雄性中作用于塞托利细胞,所述细胞是所述激素的公认靶标,并且支持精子成熟过程 (精子发生)。在前列腺中也产生 FSH,在这里它是细胞生长的重要介质。

[0005] 因此,FSH 释放的抑制剂可在雄性和雌性中用作避孕剂。

[0006] 除对生殖力的功能之外,FSH 还在几种疾病状态中发挥作用。FSH 受体的水平的增加与前列腺癌相关,其中最高的 FSH 受体水平与激素不应性的前列腺癌相关。前列腺癌是美国男性中最常见的癌症,每年新诊断病例超过 200,000 例,预期在 2010 年前列腺癌将导致大约 30,000 例死亡 (Jemal A. 等人. *Cancer statistics*, 2010. *CA Cancer J Clin* 60:277-300, 2010)。用外科手术或放射治疗的个体中的约 40% 会发展复发性前列腺癌 (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, 编 *Campbell's Urology*. 第 7 版. Philadelphia, Pa.: WB Saunders Company; 1998)。对复发性前列腺癌的最常见治疗是,通过睾丸切除术、雌激素治疗、抗雄激素物质给药、和 / 或 GnRH 激动剂 / 拮抗剂治疗来抑制睾丸酮产生。这种治疗通常导致缓解 2-3 年,然后前列腺癌变为“激素不应性的”,意思是,前列腺癌发展出了尽管血液雄激素浓度降低到去势水平但其仍然生长的能力。因此,需要用于治疗前列腺癌、特别是激素不应性前列腺癌的改进的组合物和方法。

[0007] 垂体瘤 (腺瘤) 是非癌性生长物,取决于肿瘤的具体位置,其通常影响不同的激素产生区域。垂体瘤占颅内肿瘤的约 15%,并且由于局部压力作用、激素分泌过多或治疗相关的内分泌缺乏,垂体瘤与高发病率相关 (Heaney A. P., 等人.: *Molecular Pathogenesis of Pituitary Tumors*. 见: *Oxford Textbook of Endocrinology*, Wass J. A. H. 和

Shalet S. M., (编), Oxford University Press, Oxford, 2002)。绝大部分垂体腺瘤是良性的,相对缓慢地生长。然而,垂体瘤可导致一种或多种垂体激素产生过多。FSH 分泌型垂体瘤常导致多囊卵巢的发生,并导致雌二醇水平升高。雌二醇水平的升高进而导致健康风险,包括子宫内膜癌和前列腺癌。因此,需要用于治疗与 FSH 分泌型垂体瘤相关的症状的改进的组合物和方法。

[0008] **FSH** 信号传递途径已经与宽范围的肿瘤类型中的肿瘤血管生成相关联。Radu A, 等人. N Engl J Med. 2010 Oct 21;363(17):1621-30。因此,抑制 FSH 分泌的化合物可用于多种治疗中。

[0009] 本公开内容部分地提供了 ActRIIA 的拮抗剂,其可用于抑制 FSH 产生以及其它用途。

[0010] 发明内容

除了其它方面以外,本公开内容提供了结合 ActRIIA 并抑制 ActRIIA 或激活素介导的信号传递的抗体及其片段。本文描述了这样的蛋白的多种用途。例如,所述抗体可以用于:在具有以肌肉损失或损伤为特征的疾病或病症的患者中增加肌肉量或瘦体重,在有此需要的患者中减少 FSH,治疗恶病质、特别是癌症恶病质,降低体脂肪率并从而治疗诸如肥胖症等障碍,和作为测定的一部分来鉴别已知的和新颖的 ActRIIA- 结合剂。

[0011] 本公开内容涉及结合剂,诸如抗体,其特异性地结合 ActRIIA,并且任选地抑制一种或多种 ActRIIA 配体的结合,所述 ActRIIA 配体例如激活素 A、激活素 B、GDF11、肌肉生长抑制素、BMP7 和 / 或其它已知的 ActRIIA 配体。所述结合剂可以通过它们的交叉阻断至少一种本文公开的抗体与 ActRIIA 结合的能力,和 / 或被所述抗体中的至少一种交叉阻断免于结合 ActRIIA 的能力被表征。在某些实施方案中,抗-ActRIIA 抗体或其片段可以抑制体外细胞系中的 ActRIIA 介导的信号传递。例如,通过在抗-ActRIIA 抗体存在下使表达 ActRIIA 的细胞与 ActRIIA 配体(例如,激活素 A、激活素 B、肌肉生长抑制素或 GDF-11) 接触,可以测量 ActRIIA 介导的信号传递。在某些实施方案中,结合剂(诸如中和抗体或其片段)通过同时在多个对于配体结合而言重要的残基处接触 ActRIIA 的细胞外结构域,可以抑制 ActRIIA 与一种或多种 ActRIIA 配体的结合。本公开内容部分地涉及结合剂,诸如抗体及其片段,其接触人 ActRIIA 的细胞外结构域中的一个或多个氨基酸,所述氨基酸选自:(a) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 13 处的苯丙氨酸,(b) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 14 处的苯丙氨酸,(c) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 15 处的天冬酰胺,(d) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 17 处的天冬酰胺,(e) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 21 处的天冬氨酸,(f) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 22 处的精氨酸,(g) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 23 处的苏氨酸,(h) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 29 处的谷氨酸,(i) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 30 处的脯氨酸,(j) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 31 处的半胱氨酸,(k) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 32 处的酪氨酸,(l) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 33 处的甘氨酸,(m) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 34 处的天冬氨酸,(n) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 36 处的天冬氨酸,(o) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 37 处的赖氨酸,(p) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 39 处的精氨酸,(q) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 40 处的组氨酸,(r) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 42 处的苯丙氨酸,(s) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 44 处的苏氨酸,(t) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 46 处的赖氨酸,(u) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 55 处的缬氨酸,(v) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 56 处的赖氨酸,(w) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 57 处的谷

氨酰胺, (x) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 58 处的甘氨酸, (y.) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 59 处的半胱氨酸, (z) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 60 处的色氨酸, (aa) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 61 处的亮氨酸, (bb) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 62 处的天冬氨酸, (cc) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 63 处的天冬氨酸, (dd) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 64 处的异亮氨酸, (ee) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 65 处的天冬酰胺, (ff) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 66 处的半胱氨酸, (gg) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 76 处的赖氨酸, (hh) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 80 处的谷氨酸, (ii) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 81 处的缬氨酸, (jj) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 83 处的苯丙氨酸, 和 (kk) 在 SEQ ID NO: 16 的位置 85 处的半胱氨酸。

[0012] 在 ActRIIA 结合抗体或其片段中的多个残基可以用于接触 ActRIIA 的细胞外结构域中的区域, 用于中和 ActRIIA 信号传递的目的。如本文所述, 在 VH 中的高度保守的残基包括 2 个半胱氨酸, 它们可以充当用于表示可变残基的参考点。在某些方面, 本公开内容涉及结合剂, 诸如抗体及其片段, 其包含一个或多个氨基酸, 所述氨基酸选自由下述氨基酸组成的 VH 残基集合: (a) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 -20 处的缬氨酸, (b) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +4 处的甘氨酸, (c) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +5 处的酪氨酸, (d) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +9 处的丝氨酸, (e) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +10 处的甘氨酸, (f) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +11 处的酪氨酸, (g) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +12 处的酪氨酸, (h) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +32 处的酪氨酸, (i) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +37 处的天冬酰胺, (j) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +4 处的丙氨酸, (k) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +5 处的酪氨酸, (l) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +6 处的精氨酸, (m) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +7 处的天冬酰胺, (n) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +8 处的天冬氨酸, (o) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +10 处的精氨酸, (p) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +12 处的丙氨酸, (q) 从 SEQ ID NO: 12 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +13 处的酪氨酸; 和 (r) 前述任一个的保守置换。

[0013] 在 VL 中的高度保守的残基也包括 2 个半胱氨酸, 它们可以充当用于表示可变残基的参考点。在某些方面, 本公开内容涉及结合剂, 诸如抗体及其片段, 其包含一个或多个氨基酸, 所述氨基酸选自由下述氨基酸组成的 VL 残基集合: (a) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +5 处的天冬氨酸, (b) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +7 处的丝氨酸, (c) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +9 处的天冬酰胺, (d) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +10 处的苯丙氨酸, (e) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +27 处的酪氨酸, (f) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +28 处的苯丙氨酸, (g) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +30 处的丝氨酸, (h) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +31 处的精氨酸, (i) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +32 处的亮氨酸, (j) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₁ 计起, 在位置 +34 处的丝氨酸, (k) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 -21 处的丝氨酸, (l) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +3 处的甘氨酸, (m) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +4 处的天冬酰胺, (n) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +5 处的苏

氨酸, (o) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +6 处的亮氨酸, (p) 从 SEQ ID NO: 13 的半胱氨酸₂ 计起, 在位置 +8 处的色氨酸, 和 (q) 前述任一个的保守置换。

[0014] 本文提供了结合剂, 诸如抗体及其片段, 其特异性地结合 ActRIIA, 且其包含至少一个选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 序列、或由所述 CDR 序列组成、或基本上由所述 CDR 序列组成, 以及与前述任一种具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。本文还提供了结合剂, 诸如抗体及其片段, 其特异性地结合 ActRIIA, 且其包含至少 2 个选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 序列、或由所述 CDR 序列组成、或基本上由所述 CDR 序列组成, 以及与前述任一种具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。在另一个实施方案中, 提供了结合剂, 诸如抗体及其片段, 其特异性地结合 ActRIIA, 且其包含至少 3 个选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 序列、或由所述 CDR 序列组成、或基本上由所述 CDR 序列组成, 以及与前述任一种具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。另一个实施方案提供了结合剂, 诸如抗体及其片段, 其特异性地结合 ActRIIA, 且其包含至少 4 个选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 序列、或由所述 CDR 序列组成、或基本上由所述 CDR 序列组成, 以及与前述任一种具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。另一个实施方案提供了结合剂, 诸如抗体及其片段, 其特异性地结合 ActRIIA, 且其包含至少 5 个选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 序列、或由所述 CDR 序列组成、或基本上由所述 CDR 序列组成, 以及与前述任一种具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。在另一个实施方案中, 提供了结合剂, 诸如抗体及其片段, 其特异性地结合 ActRIIA, 且其包含至少 6 个选自 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的 CDR 序列、或由所述 CDR 序列组成、或基本上由所述 CDR 序列组成, 以及与前述任一种具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。

[0015] 本公开内容另外涉及结合剂, 诸如抗体及其片段, 其包含 3 个 CDR: CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3, 其中 CDR-H1 包含与 SEQ ID NO: 4 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的序列, CDR-H2 包含与 SEQ ID NO: 5 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的序列, CDR-H3 包含与 SEQ ID NO: 6 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的序列。

[0016] 在某些实施方案中, 本公开内容涉及结合剂, 诸如抗体及其片段, 其包含重链, 所述重链包含与 SEQ ID NO: 12 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。在另一个实施方案中, 本发明涉及结合剂, 诸如抗体及其片段, 其包含轻链, 所述轻链包含与 SEQ ID NO: 13 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。在另一个实施方案中, 本发明涉及结合剂, 诸如抗体及其片段, 其包含重链和轻链, 其中所述重链包含与 SEQ ID NO: 12 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽, 且所述轻链包含与 SEQ ID NO: 13 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 同一性的多肽。

[0017] 在另一个实施方案中, 本公开内容涉及一种产生能够特异性地结合 ActRIIA 的抗体的方法, 所述方法包括: 用衍生自 ActRIIA 的抗原多肽免疫活的纯合的 ActRIIA- 缺陷型小鼠。

[0018] 本发明另外涉及一种治疗患者的病症的方法, 所述患者具有不希望的 ActRIIA 或激活素介导的信号传递, 所述病症包括、但不限于癌症、升高的 FSH 和瘦体重不足或肥胖, 所述方法包括: 施用有效量的 ActRIIA 结合剂, 诸如抗体或其片段。

[0019] 在某些方面, 本公开内容涉及可以治疗 ActRIIA 相关的病症的抗体, 所述病症例如神经肌肉障碍 (例如, 肌营养不良和肌肉萎缩)、充血性阻塞性肺疾病或肺气肿 (和有关

的肌肉消瘦)、肌肉消瘦综合征、少肌症、恶病质、脂肪组织障碍(例如,肥胖)、II型糖尿病和骨退行性疾病(例如,骨质疏松症)。本发明的 ActRIIA-结合剂与本文所述的常规癌症治疗相组合可以用于减少前列腺癌中的 FSH,或增加癌症恶病质中的肌肉。因此,结合 ActRIIA 的抗体及其片段可以与用于在有此需要的患者中治疗、预防或控制前列腺癌或癌症恶病质的疗法联合使用。如在实施例中所证实的,抑制与 ActRIIA 结合的激活素 A 和/或激活素 B 的抗体可以在体内用于降低 FSH 水平、增加肌肉、减少脂肪和改善恶病质。

[0020] 本发明也提供了药物组合物,其包含所述 ActRIIA 结合剂,诸如抗体或其片段,其中可以存在一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。如本文所公开的,所述抗体或其片段可以与 Fc、聚乙二醇、白蛋白或转铁蛋白中的至少一种缀合。

[0021] 在参考下面的详述和附图以后,会明白本发明的这些和其它方面。本文所公开的所有参考文献特此通过引用整体并入,如同每篇被单独并入。

[0022] 附图说明

图 1 描绘了 Ab-14E1 的重链可变区(VH)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 12)。2 个突出显示的氨基酸可以被包括以完成 J 片段(标有下划线)。

[0023] 图 2 描绘了 Ab-14E1 的轻链可变区(VL)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)。

[0024] 图 3 描绘了编码 Ab-14E1 的 VH 的核苷酸序列(SEQ ID NO: 14)。6 个突出显示的核苷酸可以被包括以完成 J 片段。2 个替代性的活性 N-端序列被显示为“原始”和“最终”。

[0025] 图 4 描绘了编码 Ab-14E1 的 VL 的核苷酸序列(SEQ ID NO: 15)。

[0026] 图 5 描绘了在 14E1 Fab VH 序列中的决定特异性的残基(SDR,突出显示,标有星号),通过 x-射线结晶分析测得,其在高亲和力结合以后接触人 ActRIIA 细胞外结构域(ECD)。在 VH 中的 2 个半胱氨酸被编号,且 CDR 序列标有下划线。

[0027] 图 6 描绘了人 ActRIIA ECD 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 16),并鉴定通过结晶分析测得的在高亲和力结合以后与 14E1 Fab VH 接触的残基(突出显示,标有星号)。

[0028] 图 7 描绘了在 14E1 Fab VL 序列中的决定特异性的残基(SDR,突出显示,标有星号),通过结晶分析测得,其在高亲和力结合以后接触人 ActRIIA ECD。在 VL 中的 2 个半胱氨酸被编号,且 CDR 序列标有下划线。

[0029] 图 8 描绘了人 ActRIIA ECD 的氨基酸序列,并鉴定通过结晶分析测得的在高亲和力结合以后与 14E1 Fab VL 接触的残基(突出显示,标有星号)。

[0030] 图 9 描绘了通过基于 BIACORE™的分析测得的、与 Ab-14E1 结合的 ActRIIA-Fc 的动力学。A. 用共价地固定化的抗-mFc IgG 将 Ab-14E1 捕获在芯片上,然后将其暴露于不同浓度的 ActRIIA-Fc。B. 非线性回归分析得到 12 pM 的 K_D ,这是近似值,因为用于计算它的解离速率常数(k_d , $10^{-6} s^{-1}$)太慢而难以准确测量。RU,相对单位。

[0031] 图 10 描绘了 Ab-14E1 的阻断 ActRIIA-Fc 与不同 ActRIIA 配体结合的能力。A. 在该基于 BIACORE™的测定中,首先允许 ActRIIA-Fc 结合捕获的 Ab-14E1,然后暴露于激活素 A、激活素 B、激活素 AB、BMP-10、GDF-3、GDF-8 或 GDF-11(每种在 20 nM)。B. 如几乎平坦的响应曲线所示,Ab-14E1 几乎完全抑制了这些配体与 ActRIIA-Fc 的结合。

[0032] 图 11 描绘了反转蛋白构型用于证实 Ab-14E1 的阻断 ActRIIA-Fc 与不同 ActRIIA 配体的结合的能力的用途。A. 在该基于 BIACORE™的测定中,使捕获的 ActRIIA-Fc 允许结合 Ab-14E1,然后暴露于激活素 A、激活素 B、激活素 AB、BMP-10、GDF-3、GDF-8 或 GDF-11(每

种在 20 nM)。B. 象在图 10 中一样, Ab-14E1 几乎完全抑制了所述配体与 ActRIIA-Fc 的结合。

[0033] 图 12 描绘了 ActRIIA 配体的竞争性地抑制 ActRIIA-Fc 与 Ab-14E1 的结合的能力。A. 在该基于 BIACORE™的测定中, 使捕获的 Ab-14E1 暴露于含有固定浓度 (50 nM) 的 ActRIIA-Fc 的溶液, 所述 ActRIIA-Fc 与不同浓度的给定配体 (激活素 A、激活素 B、激活素 AB、BMP-10 或 GDF-11) 预混合。B. 在试验的最高浓度 (100 nM), 激活素 A (显示) 和 BMP-10 使 ActRIIA-Fc 与 Ab-14E1 的结合抑制了 95%, 而其它配体在该浓度表现出更低的抑制程度。

[0034] 图 13 描绘了 Ab-14E1 在基于细胞的测定中中和激活素 A 介导的信号传递的能力。在 A204 细胞 (其中激活素 A 对报道基因表达的作用主要由 ActRIIA 介导) 中, Ab-14E1 以浓度依赖性的方式抑制激活素 A 刺激的基因表达, IC_{50} 为 57.1 ng/ml。

[0035] 图 14 描绘了 Ab-14E1 对切除卵巢的 (OVX) 或假手术的小鼠中的促卵泡激素 (FSH) 的血清水平的影响。平均值 \pm SEM; **, $p < 0.01$, 相对于 OVX + 媒介物。Ab-14E1 治疗使 OVX 小鼠的 FSH 水平下降超过 50%。

[0036] 图 15 描绘了 Ab-14E1 对抑制素缺陷型雄性小鼠的体重的影响, 所述小鼠患有癌症恶病质样综合征。并行的定量给药和体重测量开始于第 0 天, 并持续至动物死亡; 显示了至第 80 天的结果。与媒介物相比改善的体重曲线证实, Ab-14E1 治疗会减轻肿瘤依赖性的恶病质。

[0037] 图 16 描绘了 Ab-14E1 对正常小鼠的体重增加的影响。*, $p < 0.05$, 相对于在对应研究天的媒介物。与对照相比, 用 Ab-14E1 治疗的小鼠在整个研究期间表现出显著更大的重量增加。

[0038] 图 17 描绘了在研究结束时通过全身 NMR 测得的 Ab-14E1 对正常小鼠的瘦体质增加的影响。***, $p < 0.001$, 相对于媒介物。在治疗 4 周后, 用 Ab-14E1 治疗的小鼠的瘦体质增加是对照的 2 倍多。

[0039] 具体实施方式

1. 综述

转化生长因子- β (TGF- β) 超家族包含多种生长因子, 它们具有共同的序列元件和结构基序。已知这些蛋白在脊椎动物和无脊椎动物中对多种细胞类型发挥生物作用。该超家族的成员在胚胎发育过程中在图式形成和组织特化方面行使重要功能, 并且可以影响多种分化过程, 包括脂肪生成、肌发生、软骨发生、心脏生成、血细胞生成、神经发生和上皮细胞分化。通过操纵 TGF- β 家族成员的活性, 经常可能导致生物体中的显著生理学改变。例如, 皮埃蒙特 (Piedmontese) 和比利时蓝牛 (Belgian Blue cattle) 品种携带 GDF8 (也称作肌肉生长抑制素 (myostatin)) 基因中的功能丧失突变, 其导致肌肉量的显著增加。Grobet 等人, *Nat Genet.* 1997, 17(1):71-4。此外, 在人类中, GDF8 的无活性等位基因与增加的肌肉量相关, 并且, 据报道, 与异常强度相关。Schuelke 等人, *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8。

[0040] 激活素是二聚多肽生长因子, 其属于 TGF- β 超家族。存在三种主要的激活素形式 (A、B 和 AB), 其为两种密切相关的 β 亚基的同 / 异二聚体 ($\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)。人基因组还编码激活素 C 和激活素 E, 它们主要在肝中表达。在 TGF- β 超家族中, 激活素是独特

的和多功能的因子,它可以刺激卵巢和胎盘细胞中的激素生成,支持神经元细胞存活,根据细胞类型正面地或负面地影响细胞周期进程,并至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层的分化(DePaolo 等人, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson 等人, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963)。此外,已经发现从刺激后的人单核细胞白血病细胞分离的红细胞分化因子(EDF)与激活素 A 相同(Murata 等人, 1988, PNAS, 85:2434)。已经表明,激活素 A 的作用是骨髓中的红细胞生成的天然正调节物。在一些组织中,激活素信号传递被它的相关异二聚体(即抑制素)所拮抗。例如,在从垂体释放促卵泡激素(FSH)的过程中,激活素促进 FSH 分泌和合成,而抑制素阻止 FSH 分泌和合成。其它可调节激活素生物活性和/或结合激活素的蛋白包括滤泡素抑制素(FS)、滤泡素抑制素相关蛋白(FSRP)、 α_2 -巨球蛋白、Cerberus 和内皮糖蛋白。

[0041] 激活素信号由 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合物介导,该复合物在受到配体刺激后磷酸化和激活下游 Smad 蛋白(Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178)。这些 I 型和 II 型受体为跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸的区域的配体结合胞外结构域、跨膜结构域、和具有预测的丝氨酸/苏氨酸特异性的胞质结构域组成。I 型受体为信号传递所必需;在结合配体和 I 型受体的表达中需要 II 型受体。I 型和 II 型激活素受体在配体结合后形成稳定的复合物,导致 I 型受体被 II 型受体磷酸化。

[0042] 两种相关的 II 型受体(ActRIIA 和 ActRIIB)已被鉴定为激活素 A、B、AB、C 和 E 的 II 型受体(Mathews 和 Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano 等人, 1992, Cell 68: 97-108)。除了激活素外,ActRIIA 和 ActRIIB 可以与一些其它的 TGF- β 家族蛋白(包括 BMP7、Nodal、BMP9、BMP10、GDF8 和 GDF11)发生生物化学相互作用(Yamashita 等人, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee 和 McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo 和 Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh 等人, 2002, Genes Dev. 16:2749-54)。ALK4 是激活素(特别是激活素 A)的主要的 I 型受体,而 ALK-7 也可充当激活素(特别是激活素 B)的受体。

[0043] 已经提议将激活素信号传递途径的抑制剂用于治疗多种障碍,包括肌肉损失、过度的 FSH、肥胖、骨丢失、多种肿瘤(包括多发性骨髓瘤和乳腺癌)和贫血。据我们所知,尚未制备结合 ActRIIA 并抑制 TGF- β 超家族的成员的信号传递的抗体。尽管已经知晓 ActRIIA 几乎 20 年,但在人、鼠和其它脊椎动物 ActRIIA 序列之间的高度保守,以及报道的 ActRIIA 敲除动物的致死率,可能已经阻止了中和性抗-ActRIIA 抗体的生产。如本文证实的,可以生产中和 ActRIIA 信号传递的抗-ActRIIA 抗体,且本公开内容提供了广泛的结构和功能表征,以使得多种中和性抗-ActRIIA 抗体及其片段可被得到。

[0044] 如本文证实的,中和性抗-ActRIIA 抗体可以用于多种适应症,包括治疗癌症和恶病质,以及降低有此需要的患者中的 FSH 水平。

[0045] 在本发明的上下文中以及在使用每个术语的特定的上下文中,在本说明书中所用的术语通常具有其在本领域中的普通含义。在下文或者说明书的其它部分讨论了某些术语,以在描述本发明的组合物和方法以及如何制造和使用它们的方面为从业者提供额外的指导。术语的任何使用范围或含义将从使用该术语的特定上下文显而易见。

[0046] “约”和“大约”一般应表示考虑到测量法的性质和精确性,测得的量的可接受误差程度。典型地,示例性误差程度为在给定的数值或数值范围的 20% 以内,优选在 10% 以内,

更优选在 5% 以内。可替换地,且特别是在生物系统中,术语“约”和“大约”可表示在给定值的一定数量级内、优选在 5 倍以内、更优选在 2 倍以内的值。除非另有说明,本文给出的数量为近似值,这意味着,在未明确指出时,可推出术语“约”或“大约”。

[0047] 本发明的方法可包括对序列彼此对比的步骤,包括将野生型序列与一种或多种突变体(序列变体)进行对比。此类对比通常包括聚合物序列的比对,例如,采用本领域熟知的序列比对程序和/或算法(例如,BLAST、FASTA 和 MEGALIGN,仅举几个实例)进行。技术人员可容易地理解:在此类对比中,当突变包含残基插入或缺失时,该序列比对将在不包含该插入或缺失的残基的聚合物序列中引入“空位”(通常由破折号或“A”表示)。除非另外指出,BLAST 应当是用于对比的默认算法。

[0048] 以它的所有语法形式和拼写变化表示的“同源的”均指具有“共同进化起源”的两种蛋白(包括来自相同生物物种的超家族的蛋白,以及来自不同生物物种的同源蛋白)之间的关系。此类蛋白(及其编码核酸)具有序列同源性,这反映在它们的序列相似性,不管是在同一性百分比方面还是在特定残基或基序以及保守位置的存在方面。

[0049] 以它的所有语法形式表示的术语“序列相似性”指可共有或可不共有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应性程度。

[0050] 然而,在通常的使用以及在本申请中,当术语“同源的”被副词例如“高度”修饰时,可表示序列相似性,并可涉及或可不涉及共同进化起源。

[0051] 本文使用的术语“ActRIIA”指来自任意物种的激活素 IIA 型受体 (ActRIIA) 蛋白以及从这种 ActRIIA 蛋白衍生的变体的家族。本文对 ActRIIA 的提及应理解为提及目前鉴定的形式中的任意一种。该 ActRIIA 家族的成员通常为跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸的区域的配体结合胞外结构域、跨膜结构域以及具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域组成。

[0052] 人 ActRIIA 前体蛋白序列如下,其中标有下划线的序列与文献报道的成熟的细胞外结构域相对应,其中存在中和性抗-ActRIIA 抗体和其它 ActRIIA 结合剂所靶向的表位。

```

MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTOPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPL
MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGI
ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPPVL
RDYQK HAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMORLTNIIT
TEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL
(SEQ ID NO: 1)

```

[0053] 编码人 ActRIIA 前体蛋白的核酸序列如下 (Genbank entry NM_001616 的核苷酸

164-1705) :

```
atgggagctgctgcaaagttggcgtttgccgtctttcttatctcctgttcttcagggtgctatacttggtaga
tcagaaactcaggagtgtcttttctttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaatcaaactgggtgtgaaccgtg
ttatgggtgacaaagataaacggcgccattgttttgctacctggaagaatatttctgggtccattgaaatagtgaac
aaggttgttggtgctggatgatatacaactgctatgacaggactgattgtgtagaaaaaaagacagccctgaagtatat
ttttgttgctgtgagggcaatatgtgtaatgaaaagttttcttattttccagagatggaagtcacacagcccacttc
aaatccagttacacctaagccaccctattacaacatcctgctctattccttggtgccacttatgttaattgcgggga
ttgtcattttgtgcattttgggtgtacagggcatcacaagatggcctaccctcctgtacttgttccaactcaagacca
ggaccacccccaccttctcattactagggttgaaaccactgcagttattagaagtgaagcaagggaagatttgg
ttgtgtctggaaagcccagttgcttaacgaatatgtggctgtcaaaaatttccaatacaggacaaacagtcagtc
aaaatgaatacgaagtctacagtttgccctggaatgaagcatgagaacatattacagttcattgggtgcagaaaaacga
ggcaccagtgttgatgtggatctttggctgatcacagcatttcatgaaaagggttcactatcagactttcttaagggc
taatgtggtctcttggaatgaactgtgtcatattgcagaaacctggctagaggattggcatatttacatgaggata
tacctggcctaaaagatggccacaaacctgccatattctcacagggacatcaaaagtaaaaatgtgctgttgaaaaac
aacctgacagcttgcatgtgactttgggttgcccttaaaatttgaggctggcaagtctgcaggcgatacccatgg
acaggttggtagccggaggtacatggctccagaggtattagagggtgctataaacttcaaagggatgcatttttga
ggatagatatgtatgccatgggattagtcctatgggaactggcttctcgtgtactgctgcagatggacctgtagat
gaatacatgttgccatttgaggaggaaattggccagcatccatctcttgaagacatgcaggaagttgttgtgcataa
aaaaaagaggcctgttttaagagattattggcagaaacatgctggaatggcaatgctctgtgaaaccattgaagaat
gttgggatcacgacgcagaagccaggttatcagctggatgtgtaggtgaaagaattaccagatgcagagactaaca
aatattattaccacagaggacattgtaacagtggtcacaatggtgacaaatggtgactttctcccaaagaatctag
tctatga
```

(SEQ ID NO: 2)

2. ActRIIA 结合剂

本发明部分地涉及含有被也结合全长 ActRIIA 的抗体所识别的表位的 ActRIIA 蛋白区域,以及制备和使用这些表位的方法。本发明还提供了特异性地结合 ActRIIA 或 ActRIIA 的部分的结合剂(例如抗体),以及使用这种结合剂的方法。所述结合剂可用于阻断或破坏人 ActRIIA 与一种或多种配体的结合,以及干扰人 ActRIIA 的生物活性。

[0054] 本领域技术人员将理解,在 ActRIIA 的直系同源物之间具有高度的序列同一性。已经描述了人 ActRIIA 的鼠直系同源物 (NCBI Ref. Seq. : NP_031422),其差别之处在于成熟的 494 氨基酸蛋白中的仅 2 个置换,同时已经描述了大鼠直系同源物 (NCBI Ref. Seq. : NP_113759),其差别之处在于仅 3 个置换。因此,在结合剂的识别位点(例如,抗体结合位点诸如表位)是高度保守的并特别地与人序列几乎或完全相同的情况下,预期结合人 ActRIIA 的试剂会结合鼠 ActRIIA 或大鼠 ActRIIA。因此,当使用术语“特异性结合 ActRIIA”时,将被理解为包括与多种物种的 ActRIIA 的结合,其中所述物种之间的序列是保守的。

[0055] 根据本发明的结合剂的实例包括抗体 14E1 (Ab-14E1)。本文使用的 Ab-14E1 包含由 SEQ ID NO: 14 和 15 所示的核苷酸表达的多肽。

[0056] 本发明的结合剂通常是如本文所定义的抗体或其片段。术语“抗体”是指完整抗体或其结合片段。抗体可包括完整的抗体分子(包括具有全长重链和 / 或轻链的多克

隆、单克隆、嵌合、人源化或人类形式),或包括其抗原结合片段。抗体片段包括 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、Fv、Fc 和 Fd 片段,并且可被掺入单结构域抗体、单链抗体、大抗体(maxibody)、微抗体(minibody)、胞内抗体(intrabody)、双抗体(diabody)、三链抗体(triabody)、四抗体(tetrabody)、v-NAR 和双 scFv(参见,例如, Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136)。抗体样多肽还被公开在美国专利号 6,703,199["Artificial Antibody Polypeptides(人工抗体多肽)",转让给 Research Corp Technologies] 中,其包括纤连蛋白多肽单抗(monobody)。其它抗体样多肽被公开在美国专利公布 2005/0238646 中,其为单链多肽。本文使用的分离的抗体或其抗原结合片段可以是多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体等。在这些类型的结合剂中的每一种中,通常预见到,可以插入来自本文公开的抗体的一种或多种 CDR 以产生替代性的 ActRIIA 结合剂。

[0057] 根据本发明的抗体可以属于任意免疫球蛋白种类,例如 IgG (包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 和 IgG2/4 杂合体)、IgE、IgM、IgD 或 IgA。它可从动物例如禽类(例如鸡)和哺乳动物获得或衍生,所述哺乳动物包括、但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、牛、马、绵羊、山羊、骆驼、人或其它灵长类动物。所述抗体可以是内化抗体。

[0058] 衍生自抗体的抗原结合片段可通过例如抗体的蛋白水解来获得,例如根据常规方法将整个抗体用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化。举例来说,通过用胃蛋白酶将抗体酶促裂解来提供被称作 $F(ab')_2$ 的 5S 片段,可以产生抗体片段。可使用硫醇还原剂将该片段进一步裂解,以产生 3.5S Fab 一价片段。任选地,可使用由二硫键的裂解所产生的巯基的阻断基来进行裂解反应。作为备选方案,使用木瓜蛋白酶的酶促裂解直接产生两个一价 Fab 片段和一个 Fc 片段。这些方法描述在下述文献中:例如, Goldenberg, 美国专利号 4,331,647, Nisonoff 等人, Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman 等人, Methods in Enzymology 1:422 (Academic Press 1967); 和 Andrews, S. M. 和 Titus, J. A. Current Protocols in Immunology (Coligan J. E., 等人编), John Wiley & Sons, New York (2003), 第 2.8.1-2.8.10 和 2.10A.1-2.10A.5 页。还可使用裂解抗体的其它方法,例如将重链分离以形成一价轻-重链片段(Fd)、进一步裂解片段,或其它酶促、化学或遗传学技术,只要片段结合被完整抗体所识别的抗原。

[0059] 抗体片段还可以是任何合成蛋白或遗传工程蛋白。例如,抗体片段包括由轻链可变量区组成的分离的片段、由重链和轻链的可变量区组成的“Fv”片段、其轻和重可变量区通过肽接头连接的重组单链多肽分子(scFv 蛋白)。

[0060] 另一种形式的抗体片段是,包括抗体的一个或多个互补决定区(CDR)的肽。通过构建编码感兴趣的 CDR 的多核苷酸,可以获得 CDR (还被称作“最小识别单位”或“高变区”)。例如如下制备这样的多核苷酸:使用产生抗体的细胞中的 mRNA 作为模板,使用聚合酶链式反应来合成可变量区(参见,例如, Larrick 等人, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,” Monoclonal Antibodies. Production, Engineering and Clinical Application, Ritter 等人.(编), 第 166 页 (Cambridge University Press 1995); 和 Ward 等人, “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,” Monoclonal

Antibodies: Principles and Applications, Birch 等人, (编), 第 137 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995))。

[0061] 因此,在一个实施方案中,结合剂包括本文所述的至少一个 CDR。结合剂可包括本文所述的至少 2、3、4、5 或 6 个 CDR。结合剂还可包括本文所述抗体的至少一个可变区结构域。所述可变区结构域可以具有任何尺寸或氨基酸组成,并且通常将包括至少一个负责结合人 ActRIIA 的 CDR 序列,例如本文所特别描述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 和 / 或轻链 CDR,并且其与一个或多个框架序列相邻或一起在框内。概括地讲,可变(V)区结构域可以是免疫球蛋白重(VH)和 / 或轻(VL)链可变结构域的任何适合的排列。因此,例如,V 区结构域可以是单体,并且是 VH 或 VL 结构域,其能够如下所述以至少等于 $1 \times 10^{-7}M$ 或更低的亲和力独立地结合人 ActRIIA。可替换地,V 区结构域可以是二聚体,并含有 VH-VH、VH-VL 或 VL-VL 二聚体。V 区二聚体包括至少一个 VH 和至少一个 VL 链,其可能是非共价缔合的(在下文中被称作 FV)。如果需要的话,可将链直接地共价偶联,例如通过两个可变结构域之间的二硫键,或者通过接头,例如肽接头,以形成单链 Fv (scFv)。

[0062] 可变区结构域可以是任何天然存在的可变结构域或其工程化形式。工程化形式是指使用重组 DNA 工程技术产生的可变区结构域。这种工程化形式包括,例如通过在或向特定抗体氨基酸序列中的插入、缺失或改变而从特定抗体可变区产生的那些。具体实例包括这样的工程化的可变区结构域:其含有至少一个 CDR 以及任选的来自第一抗体的一个或多个框架氨基酸和来自第二抗体的可变区结构域的剩余部分。

[0063] 可变区结构域可在 C 端氨基酸处与至少一个其它抗体结构域或其片段共价连接。因此,例如,存在于可变区结构域中的 VH 结构域可连接至免疫球蛋白 CH1 结构域或其片段。相似地,VL 结构域可连接至 CK 结构域或其片段。以此方式,例如,所述抗体可以是 Fab 片段,其中抗原结合结构域含有缔合的 VH 和 VL 结构域,所述 VH 和 VL 结构域在它们的 C 端处分别共价连接至 CH1 和 CK 结构域。可以用更多的氨基酸将 CH1 结构域延伸,例如以便提供铰链区或如在 Fab 片段中发现的铰链区结构域的一部分,或者以便提供其它结构域,例如抗体 CH2 和 CH3 结构域。

[0064] 如本文所述,结合剂可以包括这些 CDR 中的至少一个。例如,可将一个或多个 CDR 掺入已知的抗体框架区(IgG1、IgG2 等),或者缀合至适合的媒介物以增加其半衰期。适合的媒介物包括、但不限于:Fc、聚乙二醇(PEG)、白蛋白、转铁蛋白等。这些和其它适合的媒介物是本领域中已知的。这种缀合的 CDR 肽可以是单体、二聚体、四聚体或其它的形式。在一个实施方案中,一种或多种水溶性的聚合物键合在结合剂的一个或多个特定位置,例如氨基末端。

[0065] 在某些实施方案中,结合剂包括一种或多种水溶性的聚合物附着物,其包括、但不限于聚乙二醇、聚氧乙烯二醇或聚丙二醇。参见,例如,美国专利号 4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192 和 4,179,337。在某些实施方案中,衍生物结合剂包括单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纤维素或其它基于碳水化合物的聚合物、聚-(N-乙基吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,甘油)和聚乙烯醇中的一种或多种,以及这些聚合物的混合物。在某些实施方案中,一种或多种水溶性的聚合物随机地连接于一个或多个侧链。在某些实施方案中,PEG 可起作用以增进结合剂(例如抗体)的治疗能力。在例如美国专利号 6,133,426 中讨论了某些这样的方

法,其特此通过引用并入本文用于任何目的。

[0066] 通过本文所述的和本领域已知的常规免疫接种和细胞融合操作,可以获得根据本发明的抗体。可使用各种已知技术来产生本发明的单克隆抗体。通常,通过本领域技术人员已知的方法,可以获得结合特定抗原的单克隆抗体(参见,例如, Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Coligan 等人.(编), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.12.6.7 (John Wiley & Sons 1991); 美国专利号 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) (1980); 和 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow 和 Lane (编), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Picksley 等人, "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," DNA Cloning 2: Expression Systems, 第2版, Glover 等人.(编), 第93页 (Oxford University Press 1995))。可如下从其衍生出抗体片段:使用任何适合的标准技术,例如蛋白水解消化,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),之后将二硫键温和还原并且烷基化。可替换地,还可通过本文所述的重组遗传工程技术来产生这种片段。

[0067] 根据本领域已知的和本文所述的方法,通过给动物(例如,大鼠、仓鼠、兔,或优选小鼠,优选 ActRIIA⁻缺陷型小鼠)注射包括 SEQ ID NO: 1 的人 ActRIIA 或其片段的免疫原,可以获得单克隆抗体。由于 ActRIIA⁻缺陷型小鼠(即 Acvr2^{-/-}敲除的小鼠)具有大幅下降的生存力和其它缺陷,需要小心地获得足够健康的且适当繁育的小鼠。在最初注射之后和/或强化注射之后,通过获得血清样品,并使用本领域已知的和本文所述的几种免疫检测方法中的任一种,检测结合人 ActRIIA 或肽的抗体的存在,可以监测特异性抗体产生的存在。从产生期望抗体的动物中取出淋巴样细胞,最通常地为来自脾脏或淋巴结的细胞,以获得 B 淋巴细胞。然后将 B 淋巴细胞与药物致敏的骨髓瘤细胞融合配偶体相融合,以产生作为永生的真核细胞系的杂交瘤,所述骨髓瘤细胞融合配偶体优选地为与免疫动物同基因的,并且其任选地具有其它期望的特性(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)。淋巴样(例如脾)细胞和骨髓瘤细胞可与膜融合促进剂(例如聚乙二醇或非离子去污剂)混合几分钟,然后以低密度铺板在选择性培养基上,所述选择性培养基支持杂交瘤细胞的生长,但不支持未融合的骨髓瘤细胞的生长。优选的选择培养基是 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷)。在充足的时间(通常约一至二周)后,观察到细胞集落。分离单个集落,并使用本领域已知的和本文所述的各种免疫测定中的任一种来测试细胞所产生的抗体对人 ActRIIA 的结合活性。对杂交瘤进行克隆(例如通过有限稀释克隆或通过软琼脂斑分离),并选择和培养产生对 ActRIIA 具有特异性的抗体的阳性克隆。可从杂交瘤培养物的上清液中分离来自杂交瘤培养物的单克隆抗体。用于产生鼠单克隆抗体的替代方法是,将杂交瘤细胞注射进同基因小鼠的腹腔内,例如,所述同基因小鼠是已经被处理(例如用降植烷激发)以促进含有单克隆抗体的腹水液的形成的小鼠。通过多种非常确定的技术,可以分离和纯化单克隆抗体。这样的分离技术包括:使用蛋白-A 琼脂糖的亲和色谱法、尺寸排阻色谱法和离子交换色谱法(参见,例如, Coligan 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页; Baines 等人, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," Methods in Molecular Biology, 第 10 卷第 79-104 页 (The Humana Press,

Inc. 1992)。使用基于抗体的特定特征(例如重链或轻链同种型、结合特异性等)所选择的适合的配体,通过亲和色谱法,可以纯化单克隆抗体。被固定在固体支撑物上的适合的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 ActRIIa 蛋白或其片段或变体。

[0068] 本领域技术人员将理解,本发明的结合剂可具有至少一个氨基酸置换,条件是,结合剂保持结合特异性。因此,本发明的范围包括对结合剂结构的修饰。这些可包括氨基酸置换,其可以是保守的或非保守的,并且不破坏结合剂的 ActRIIA 结合能力。保守的氨基酸置换可包括非天然存在的氨基酸残基,其通常通过化学肽合成而非生物系统的合成掺入。这些包括肽模拟物和氨基酸部分的其它反转或倒置形式。保守的氨基酸置换还可包括用标准的残基置换天然的氨基酸残基,使得对该位置的氨基酸残基的极性或电荷几乎没有影响或者没有影响。

[0069] 保守置换显示在表 1 中的“优选置换”标题下面。如果这样的置换导致生物活性的改变,则可引入更实质性的变化并筛选产物,所述变化在表 1 中叫做“示例性置换”,或如下文在氨基酸分类中进一步描述。

[0070] 表 1:保守置换

原始残基	示例性置换	优选置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg; Asn; Gln; Lys	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	Ile; 正亮氨酸; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Tyr; Trp; Leu; Val; Ile; Ala	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser; Val	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Phe; Trp; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Leu; Ile; 正亮氨酸; Met; Phe; Ala	Leu

通过选择对于维持以下几方面的效果明显不同的置换,完成对抗体生物学特性的实质性修饰:(a) 置换区域中的多肽主链的结构,例如,呈折叠或螺旋构象,(b) 在靶位点处的分子的电荷或疏水性,或(c) 侧链的体积。基于共有侧链的性质,将天然存在的残基分组:

- (1) 疏水的:Met、Ala、Val、Leu、Ile、正亮氨酸;
- (2) 中性亲水的:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性的:Asp、Glu;
- (4) 碱性的:His、Lys、Arg;
- (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;和

(6) 芳族的 :Trp、Tyr、Phe。

[0071] 非保守置换可包括,用一类氨基酸或氨基酸模拟物中的成员交换另一类具有不同物理性质(例如大小、极性、疏水性、电荷)的氨基酸中的成员。这种置换的残基可被引入与非人抗体同源的人抗体的区域中,或者引入该分子的非同源区域中。

[0072] 此外,本领域技术人员可产生在每个期望的氨基酸残基处含有单个氨基酸置换的测试变体。然后可使用本文所述的活性测定来筛选所述变体。这种变体可被用来收集关于适合的变体的信息。例如,如果发现特定氨基酸的改变会导致破坏的、不期望地减少的或不适合的活性,那么可避免具有这种改变的变体。换言之,基于从这种常规实验收集的信息,本领域技术人员可容易地确定其进一步的置换应被避免的氨基酸,不论所述置换是单独的还是与其它突变一起的。

[0073] 技术人员将能够如本文前述使用熟知技术来确定多肽的适合变体。在某些实施方案中,本领域技术人员可通过靶向被认为对于活性不重要的区域来鉴定该分子中可被改变而不破坏活性的适合区域。在某些实施方案中,可鉴定在相似的多肽之间保守的分子的残基和部分。在某些实施方案中,甚至对于生物活性或结构可能重要的区域可经历保守氨基酸置换而不会破坏生物活性或不会不利地影响多肽结构。

[0074] 另外,本领域技术人员可回顾结构-功能研究以鉴定相似多肽中对于活性或结构重要的残基。鉴于这种对比,可预测蛋白中与相似蛋白中对于活性或结构重要的氨基酸残基相对应的氨基酸残基的重要性。本领域技术人员可选择用化学上相似的氨基酸来置换这种预测的重要氨基酸残基。

[0075] 本公开内容包括,与人 ActRIIA 的细胞外结构域 (ECD) 形成复合物的单克隆 Ab-14E1 Fab 片段的 x-射线结晶分析结果。如在实施例中所详述的,分析已经鉴定出 Ab-14E1 VH 中的 17 个氨基酸残基 (SEQ ID NO: 12) 和 Ab-14E1 VL 中的 16 个残基 (SEQ ID NO: 13),所述残基与人 ActRIIA ECD 中的氨基酸接触,且因此可以视作决定特异性的残基 (SDR) (Padlan 等人, FASEB J 9:133-139 (1995))。这些 SDR 中的绝大部分簇集在 CDR 内。另外 2 个 SDR 位于与 CDR 紧邻处,第一个是优选位于邻近 CDR-H1 且在第一个保守半胱氨酸 (C₁) 的 +4 个残基处的甘氨酸。预见到包含位于 SEQ ID NO: 12 中的 C₁ 的 +3 或 +5 个残基处的甘氨酸的变体。第二个这样的 SDR 是优选位于邻近 CDR-L2 且在 C₁ 的 +26 个残基处的酪氨酸,预见到包含位于 SEQ ID NO: 13 中的 C₁ 的 +24、+25、+27 或 +28 个残基处的酪氨酸的变体。最后,2 个额外的 (“卫星”) SDR 位于 CDR 外面较远处,第一个是优选位于 SEQ ID NO: 12 中的 C₁ 的 -20 个残基处的缬氨酸,第二个是优选位于 SEQ ID NO: 13 中的第二个保守半胱氨酸 (C₂) 的 -21 个残基处的丝氨酸。预见到包含位于 SEQ ID NO: 12 中的 C₁ 的 -18、-19、-21 或 -22 个残基处的缬氨酸的变体,或者包含位于 SEQ ID NO: 13 中的 C₂ 的 -19、-20、-22 或 -23 个残基处的丝氨酸的变体。预期在 33 个 SDR 位置处和在 CDR 内的非-SDR 位置处,仅保守突变会被耐受(如果有的话)。预见到变体,特别是与 SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9 的对应部分具有至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 同一性的那些。在 SDR 和 CDR 之外的框架区中,预期非保守突变将被耐受,且预见到与 SEQ ID NO: 12 和 13 的对应部分具有至少 75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 同一性的变体。

[0076] 许多科学出版物已经为二级结构预测做出了贡献。参见 Moulton J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou 等人, Biochemistry, 13(2):222-245 (1974);

Chou 等人, *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou 等人, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou 等人, *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 以及 Chou 等人, *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979)。此外,目前可使用计算机程序来辅助预测二级结构。预测二级结构的一个方法是基于同源性建模。例如,具有超过 30% 的序列同一性或超过 40% 的序列相似性的两个多肽或蛋白通常具有相似的结构拓扑。最近蛋白结构数据库(PDB)的增长提供了增强的二级结构可预测性,包括多肽或蛋白结构中折叠的潜在数量。参见 Holm 等人, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999)。据建议(Brenner 等人, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)),在给定多肽或蛋白中存在有限数量的折叠,而且一旦解析了关键数量的结构,结构预测将显著地变得更准确。

[0077] 预测二级结构的另外方法包括“穿引(threading)”(Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl 等人, *Structure*, 4(1):15-19 (1996))、“序型分析(profile analysis)”(Bowie 等人, *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov 等人, *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov 等人, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987))以及“进化连接(evolutionary linkage)”(参见 Holm, 出处同上 (1999), 和 Brenner, 出处同上 (1997))。

[0078] 本领域技术人员将理解,一些蛋白(例如抗体)可在从宿主细胞表达和分泌过程中经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和范围通常取决于被用来表达该蛋白的宿主细胞系以及培养条件。这种修饰可包括糖基化改变、甲硫氨酸或色氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺化。一种常见的修饰是,由于羧基酶的作用失去羧基端碱性残基(例如赖氨酸或精氨酸)(如在 Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995 中所述)。一旦蛋白被表达和加工,它们呈“成熟”形式。因此,应当理解,本发明包括从本发明的 DNA 的表达所得的成熟抗体。

[0079] 在某些实施方案中,结合剂的变体包括糖基化变体,其中糖基化位点的数目和/或类型与亲本多肽的氨基酸序列相比已被改变。在某些实施方案中,变体包括与天然蛋白相比较多或较少数量的 N-连接的糖基化位点。N-连接的糖基化位点的特征为序列: Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, 其中被表示为 X 的氨基酸残基可以是除了脯氨酸之外的任何氨基酸残基。用来产生该序列的氨基酸残基的置换提供添加 N-连接的碳水化合物链的潜在新位点。可替换地,消除该序列的置换将除去现存的 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,其中消除了一个或多个 N-连接的糖基化位点(通常为天然存在的那些)并且产生了一个或多个新的 N-连接的位点。另外的优选的抗体变体包括半胱氨酸变体,与亲本氨基酸序列相比其中一个或多个半胱氨酸残基缺失或被另一个氨基酸(例如丝氨酸)所置换。当抗体必须被再折叠成生物活性的构象时,例如在不可溶内含体的分离之后,半胱氨酸变体可能是有用的。半胱氨酸变体通常具有比天然蛋白少的半胱氨酸残基,并通常具有偶数个以最小化由未配对的半胱氨酸所致的相互作用。

[0080] 氨基酸置换(不论是保守的或是非保守的)可由本领域技术人员在期望这种置换时确定。在某些实施方案中,氨基酸置换可被用来鉴定针对 ActRIIA 的抗体的重要残基,或用来增加或减少本文所述的针对 ActRIIA 的抗体的亲和力。

[0081] 根据某些实施方案,优选的氨基酸置换是这样的,其:(1)减少对蛋白水解的易感性,(2)减少对氧化的易感性,(3)为了形成蛋白复合物而改变结合亲和力,(4)改变

结合亲和力和 / 或 (4) 在这种多肽上赋予或修饰其它物理化学或功能特性。根据某些实施方案,可在天然存在的序列上(在某些实施方案中,在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中)进行单个或多个氨基酸置换(在某些实施方案中,保守的氨基酸置换)。在某些实施方案中,保守的氨基酸置换通常可基本上不改变亲本序列的结构特征(例如替换氨基酸不应该倾向于破坏存在于亲本序列中的螺旋,或破坏表征所述亲本序列的其它类型二级结构)。本领域公认的多肽二级和三级结构的例子描述于:Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, 编, W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden和J. Tooze, 编., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991));和Thornton等人. Nature 354:105 (1991),它们各自通过引用并入本文。

[0082] 在某些实施方案中,本发明的结合剂可与聚合物、脂类或其它部分化学键合。

[0083] 结合剂可包括本文所述的至少一个CDR,其被掺入生物相容的框架结构中。在一个实施例中,生物相容的框架结构包括足以形成构象稳定的结构支撑物或框架或支架的多肽或其部分,其能够展示结合局部表面区域中抗原的一个或多个氨基酸序列(例如 CDR、可变区等)。这种结构可以是天然存在的多肽或多肽“折叠”(结构基序),或相对于天然存在的多肽或折叠可具有一个或多个修饰例如氨基酸添加、缺失或置换。这些支架可衍生自任何物种(或多于一个物种)的多肽,所述物种例如人、其它哺乳动物、其它脊椎动物、无脊椎动物、植物、细菌或病毒。

[0084] 通常,生物相容的框架结构是基于免疫球蛋白结构域之外的蛋白支架或骨架。例如,可使用基于纤连蛋白、锚蛋白、脂质运载蛋白、新抑癌菌素(neocarzinostatin)、细胞色素 b、CP1 锌指、PST1、卷曲螺旋、LAC1-D1、Z 结构域和 tendramisat 结构域的那些(参见,例如, Nygren 和 Uhlen, 1997, Current Opinion in Structural Biology, 7, 463-469)。

[0085] 在优选的实施方案中,应当理解,本发明的结合剂包括人源化抗体,其可使用本领域技术人员已知的技术来产生(Zhang, W., 等人, Molecular Immunology. 42(12): 1445-1451, 2005; Hwang W. 等人, Methods. 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua W F, 等人, Methods 36(1):43-60, 2005;和 Clark, M., Immunology Today. 21(8):397-402, 2000)。

[0086] 本发明的抗体还可以是人单克隆抗体。人单克隆抗体可由本领域普通技术人员熟悉的任何数量的技术所产生。这些方法包括、但不限于人外周血细胞(例如,含有 B 淋巴细胞)的爱泼斯坦-巴尔病毒(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 区噬菌体文库的分离或者本领域已知的和基于本公开内容的其它方法。例如,可从转基因小鼠获得人单克隆抗体,所述转基因小鼠已被工程化以响应于抗原攻击产生特异性人抗体。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法描述在:例如, Green 等人, Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg 等人, Nature 368:856, 1994; Taylor 等人, Int. Immun. 6:579, 1994;美国专利号 5,877,397; Bruggemann 等人, 1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovits 等人, 1995 Ann. N. Y Acad. Sci. 764:525-35。在该技术中,人重链和轻链基因座的元件被引入衍生自含有内源性重链和轻链基因座的靶向断裂的胚胎干细胞系的小鼠品系(也参见 Bruggemann 等人, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58 (1997))。例如,人免疫球蛋白

白转基因可能是小基因构建体或酵母人工染色体上的转基因座,其经受小鼠淋巴样组织中的 B 细胞特异性 DNA 重排和高变。人单克隆抗体可通过对转基因小鼠免疫来获得,其然后可能产生对 ActRIIA 有特异性的人抗体。根据本文所述的方法,被免疫的转基因小鼠的淋巴样细胞可被用来产生分泌人抗体的杂交瘤。含有人抗体的多克隆血清还可从被免疫的动物的血中获得。

[0087] 用来产生本发明人抗体的另一种方法包括通过 EBV 转化而使人外周血细胞永生。参见,例如,美国专利号 4,464,456。可通过本文所提供的免疫检测方法例如 ELISA 来鉴定产生特异性结合 ActRIIA 的单克隆抗体的这种永生化的 B 细胞系(或类淋巴母细胞细胞系),然后通过标准的克隆技术将其分离。产生抗 -ActRIIA 抗体的类淋巴母细胞细胞系的稳定性可被改进,其通过根据本领域已知方法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(参见,例如,Glasky 等人,Hybridoma 8:377-89 (1989))。产生人单克隆抗体的再一个方法是体外免疫,其包括用人 ActRIIA 对人脾 B 细胞激发,接着将激发的 B 细胞与异杂合融合配偶体相融合。参见,例如,Boerner 等人,1991, J. Immunol. 147:86-95。

[0088] 在某些实施方案中,选择产生抗人 ActRIIA 抗体的 B 细胞,并且根据本领域已知的(WO 92/02551;美国专利号 5,627,052; Babcook 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996))和本文所述的分子生物学技术从 B 细胞克隆轻链和重链可变区。通过选择产生特异性结合 ActRIIA 的抗体的细胞,可从脾、淋巴结或外周血样品分离来自被免疫动物的 B 细胞。还可从人例如从外周血样品分离 B 细胞。用于对产生具有期望特异性的抗体的单个 B 细胞进行检测的方法是本领域众所周知的,例如通过斑形成、荧光激活的细胞分选、体外刺激之后检测特异性抗体等。选择产生特异性抗体的 B 细胞的方法包括例如在含有人 ActRIIA 的软琼脂中制备 B 细胞的单细胞悬液。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,所述复合物可能是可见的免疫沉淀物。在选择了产生期望抗体的 B 细胞后,可根据本领域已知的和本文所述的方法通过将 DNA 或 mRNA 分离和扩增来克隆特异性抗体基因。

[0089] 另外,本领域技术人员将认识到,适合的结合剂包括这些抗体的部分,例如本文所具体公开的 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 中的至少一个区域可具有至少一个氨基酸置换,前提条件是,结合剂保持未置换的 CDR 的结合特异性。同样可以改变 CDR 以增加或减小长度,因而被表征为置换、插入和缺失的变化都被预见到。结合剂的非 -CDR 部分可以是非蛋白分子,其中所述结合剂交叉阻断本文所公开的抗体与 ActRIIA 的结合和 / 或中和 ActRIIA。结合剂的非 -CDR 部分可由氨基酸组成,其中所述结合剂是重组结合蛋白或合成肽,并且所述重组结合蛋白交叉阻断本文所公开的抗体与 ActRIIA 的结合和 / 或中和 ActRIIA。结合剂的非 -CDR 部分可由氨基酸组成,其中所述结合剂是重组结合蛋白,并且所述重组结合蛋白在人 ActRIIA 肽表位竞争结合测定(下文所述)中对人 ActRIIA 肽展示出与由抗体 Ab-14E1 所展示的结合模式相似的结合模式,和 / 或中和 ActRIIA。

[0090] 在一个实施方案中,预见到,可将抗体重链用作文库筛选中的“诱饵”来鉴定其中重构的抗体结合 ActRIIA 的互补的人轻链,其中所述文库由人抗体轻链所组成。在该实施方案中,所述重链来自对 ActRIIA 具有特异性的抗体,并且是小鼠的、嵌合的或人源化的。

[0091] 当抗体包括上述 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 中的一个或多个时,它可通过从含有编码这些序列的 DNA 的宿主细胞中表达而获得。可基于 CDR 的氨基酸序列来确定编码每个 CDR 序列的 DNA,并适当使用寡核苷酸合成技术、定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术将其与任何期望的抗体可变区框架和恒定区 DNA 序列一起合成。编码可变区框架和恒定区的 DNA 对于本领域技术人员是可从遗传序列数据库例如 GenBank、RTM 中广泛地获得的。

[0092] 一旦合成,编码本发明抗体或其片段的 DNA 可被增殖和表达,其是根据核酸切除、连接、转化和转染的各种熟知步骤中的任一种并使用任何数量的已知表达载体。因此,在某些实施方案中,抗体片段的表达在原核宿主例如大肠杆菌中可能是优选的(参见,例如,Pluckthun 等, 1989 *Methods Enzymol.* 178:497-515)。在某些其它实施方案中,抗体或其片段的表达在真核宿主细胞中可能是优选的,其包括酵母(例如酿酒酵母、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和巴氏毕赤酵母(*Pichia pastrois*))、动物细胞(包括哺乳动物细胞)或植物细胞。适合的动物细胞的实例包括、但不限于骨髓瘤(例如小鼠 NS0 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。

[0093] 含有编码抗体可变和 / 或恒定区的 DNA 的一个或多个可复制的表达载体可被制备并用来转化在其中将产生抗体的适合的细胞系,例如非生产骨髓瘤细胞系例如小鼠 NS0 系或细菌如大肠杆菌。为了获得有效的转录和翻译,每个载体中的 DNA 序列应包括适合的调节序列,特别是可操作地连接至可变结构域序列的启动子和前导序列。用于以该方法产生抗体的具体方法通常是熟知的和常规使用的。例如,Maniatis 等人. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989;也参见 Maniatis 等人, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)) 描述了基本的分子生物学步骤。可如 Sanger 等人 (PNAS 74:5463, (1977)) 和 Amersham International pic 测序手册所述进行 DNA 测序,并可根据本领域已知的方法进行定位诱变(Kramer 等人, *Nucleic Acids Res.* 12:9441, (1984); Kunkel *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-92 (1985); Kunkel 等人, *Methods in Enzymol.* 154:367-82 (1987); Anglian Biotechnology Ltd 手册)。另外,多种出版物描述了适合通过操作 DNA、创建表达载体并转化和培养适合的细胞来制备抗体的技术 (Mountain A 和 Adair, J R, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Tombs, M P 编, 10, 第1章, 1992, Intercept, Andover, UK);“*Current Protocols in Molecular Biology*”, 1999, F. M. Ausubel (编), Wiley Interscience, New York)。

[0094] 当希望提高根据本发明的含有一个或多个上述 CDR 的抗体的亲和力时,改进的抗体可以通过若干亲和力成熟方案获得,所述方案包括维持 CDR (Yang 等人, *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995)、链改组 (Marks 等人, *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992)、使用大肠杆菌的突变株 (Low 等人, *J. Mol. Biol.*, 250, 350-368, 1996)、DNA 改组 (Patten 等人, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997)、噬菌体展示 (Thompson 等人, *J. Mol. Biol.*, 256, 7-88, 1996) 和有性 PCR (Cramer, 等人, *Nature*, 391, 288-291, 1998)。Vaughan 等人 (*Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998) 讨论了所有这些亲和力成熟方法。

[0095] 用于获得本发明抗体的另外的方法是通过噬菌体展示。参见,例如,Winter 等人,

1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433-55; Burton 等人, 1994 Adv. Immunol. 57:191-280。可在噬菌体载体中产生人或鼠免疫球蛋白可变区基因的组合文库, 可以筛选所述文库, 以选择特异性结合 ActRIIA 或其变体或片段的 Ig 片段 (Fab、Fv、sFv 或其多聚体)。参见, 例如, 美国专利号 5, 223, 409; Huse 等人, 1989 Science 246:1275-81; Sastry 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32 (1989); Alting-Mees 等人, Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990); Kang 等人, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66; Hoogenboom 等人, 1992 J. Molec. Biol. 227:381-388; Schlebusch 等人, 1997 Hybridoma 16:47-52 和其中引用的参考文献。例如, 含有编码 Ig 可变区片段的多个多核苷酸序列的文库可被插入丝状噬菌体例如 M13 的基因组或其变体的基因组中并与编码噬菌体外壳蛋白的序列一起在框内。融合蛋白可能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物。根据某些实施方案, 免疫球蛋白 Fab 片段还可被展示在噬菌体颗粒上 (参见, 例如, 美国专利号 5, 698, 426)。

[0096] 还可在 λ 噬菌体中例如使用 λ ImmunoZap™ (H) 和 λ ImmunoZap™ (L) 载体 (Stratagene, La Jolla, 加利福尼亚) 来制备重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库。简言之, 从 B 细胞群中分离 mRNA 并在 λ ImmunoZap (H) 和 λ ImmunoZap (L) 载体中用来产生重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库。这些载体可被单独筛选或共同表达以形成 Fab 片段或抗体 (参见 Huse 等, 出处同上; 还参见 Sastry 等, 出处同上)。随后阳性噬斑可被转化为不裂解的质粒, 其允许来自大肠杆菌的单克隆抗体片段的高水平表达。

[0097] 在一个实施方案中, 在杂交瘤中, 使用核苷酸引物来扩增表达感兴趣的单克隆抗体的基因的可变区。这些引物可由本领域普通技术人员合成, 或可从商业可得的来源购得。(参见, 例如, Stratagene (La Jolla, Calif.), 其销售小鼠和人可变区的引物, 包括 VH_a、VH_b、VH_c、VH_d、CHI、VL 和 CL 区的引物等。) 这些引物可被用来扩增重链或轻链可变区, 其然后可被分别插入载体例如 ImmunoZAP™ H 或 ImmunoZAP™ (Stratagene)。这些载体然后可被引入基于大肠杆菌、酵母或哺乳动物的系统进行表达。可使用这些方法产生大量的含有 VH 和 VL 结构域的融合物的单链蛋白 (参见 Bird 等人, Science 242:423-426, 1988)。

[0098] 一旦使用任何上述免疫和其它技术来获得产生本发明抗体的细胞, 可根据本文所述的标准方法通过从中分离并扩增 DNA 或 mRNA 来克隆特定的抗体基因。从中产生的抗体可被测序并鉴定 CDR, 而且可如前述对编码 CDR 的 DNA 进行操作以产生本发明的其它抗体。

[0099] 优选地, 结合剂特异性地结合 ActRIIA。关于所有的结合剂和结合测定, 本领域技术人员意识到如下各种部分将是详尽的和不可实际列出的: 结合剂不应该与所述部分可检测地结合以便是治疗有效的和适合的。因此, 对于本文所公开的结合剂, 术语“特异性地结合”是指结合剂以比它结合不相关对照蛋白的亲合力大的亲合力结合 ActRIIA、优选地为人 ActRIIA 的能力。优选地, 所述对照蛋白是鸡蛋清溶菌酶。优选地, 结合剂以比对照蛋白的亲合力高至少 50、100、250、500、1000 或 10,000 倍的亲合力结合 ActRIIA。结合剂可具有下述的对人 ActRIIA 的结合亲合力: 小于或等于 1×10^{-7} M、小于或等于 1×10^{-8} M、小于或等于 1×10^{-9} M、小于或等于 1×10^{-10} M、小于或等于 1×10^{-11} M、或小于或等于 1×10^{-12} M。

[0100] 可通过亲和力 ELISA 测定来确定亲和力。在某些实施方案中, 可通过 BIACORE™ 测定来确定亲和力。在某些实施方案中, 可通过动力学方法来原因亲和力。在某些实施方案中, 可通过平衡 / 溶液方法来原因亲和力。这些方法在本文中被进一步详细描述或是本领域

域已知的。

[0101] 本领域普通技术人员使用常规技术,例如通过表面等离子体共振 (SPR; BIACORE™, Biosensor, Piscataway, N. J.),或者根据 Scatchard 等人 (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)) 描述的方法,可以确定结合剂(例如抗体或者结合配偶体)的亲合力,以及结合剂(例如抗体)抑制结合的程度。关于表面等离子体共振,靶分子被固定在固相上并暴露于沿着流动室运动的流动相中的配体。如果发生对固定靶的配体结合,那么局部折射率改变,并导致 SPR 角的改变,其可通过检测反射光强度的改变而被实时监控。SPR 信号的改变速率可被分析以产生结合反应的缔合和解离相的表现速率常数。这些值的比值给出表观平衡常数(亲和力)(参见,例如,Wolff 等人, Cancer Res. 53:2560-65 (1993))。

[0102] 下述的寡肽或多肽是在本发明的范围内:其氨基酸序列与在实施例中描述的 CDR (SEQ ID NO: 4、5、6、7、8 和 9) 中的至少一个具有至少 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% 同一性;和/或与特定 ActRIIA 结合剂的 CDR 具有至少 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% 同一性,所述 ActRIIA 结合剂会交叉阻断 Ab-14E1 与 ActRIIA 的结合,和/或被 Ab-14E1 交叉阻断免于结合 ActRIIA;和/或与特定 ActRIIA 结合剂的 CDR 具有至少 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% 同一性,其中所述结合剂可以在基于细胞的测定中阻断 ActRIIA 的作用(即中和 ActRIIA 的结合剂)。

[0103] 在本发明的范围内的 ActRIIA 结合剂多肽和抗体的实例是这样的:其氨基酸序列与 Ab-14E1 的可变区 (SEQ ID NO: 12 和 13) 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性,且其交叉阻断 Ab-14E1 与 ActRIIA 的结合,和/或被 Ab-14E1 交叉阻断免于结合 ActRIIA;和/或可以在基于细胞的测定中阻断 ActRIIA 的抑制作用(即中和 ActRIIA 的结合剂);和/或结合下面实施例中描述的接触残基中的一个或多个。

[0104] 编码在本发明的范围内的 ActRIIA 结合剂的多核苷酸的实例是这样的:其多核苷酸序列与编码 Ab-14E1 的可变区的多核苷酸 (SEQ ID NO: 15 和 16) 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性,且其中编码的 ActRIIA 结合剂交叉阻断 Ab-14E1 与 ActRIIA 的结合,和/或被 Ab-14E1 交叉阻断免于结合 ActRIIA;和/或可以在基于细胞的测定中阻断 ActRIIA 的抑制作用(即中和 ActRIIA 的结合剂);和/或结合下面实施例中描述的接触残基中的一个或多个。

[0105] 本发明的 ActRIIA 结合剂优选地在本文所述的基于细胞的测定中和/或本文所述的体内测定中调节 ActRIIA 功能,和/或结合下面实施例中描述的 ActRIIA 的接触残基中的一个或多个,和/或交叉阻断在本申请中描述的抗体 Ab-14E1 的结合,和/或被在本申请中描述的抗体 Ab-14E1 交叉阻断免于结合 ActRIIA。因此,使用本文所述的测定可以鉴定这样的结合剂。

[0106] 在某些实施方案中,通过首先鉴定下述抗体来产生结合剂:所述抗体结合在实施例中描述的 ActRIIA 的接触残基中的一个或多个,和/或在本文所述的基于细胞的和/或体内测定中中和和/或交叉阻断在本申请中所述的抗体 Ab-14E1,和/或被在本申请中所

述的抗体 Ab-14E1 交叉阻断免于结合 ActRIIA。来自这些抗体的 CDR 区然后被用来插入适合的生物相容的框架中,以产生 ActRIIA 结合剂。所述结合剂的非-CDR 部分可由氨基酸组成,或者可以是非蛋白分子。本文所述的测定允许结合剂的表征。优选地,本发明的结合剂是本文所定义的抗体。

[0107] 在本文所述的产生本发明抗体的方法中,其中所述方法包括对特定的 Ab-14E1 CDR 进行操作以引入新框架和 / 或恒定区中,可使用适合的测定来选择期望的抗体或结合剂(即用于确定对 ActRIIA 的结合亲和力的测定;交叉阻断测定,诸如在下面的实施例 4 中描述的基于 BIACORE™的人 ActRIIA 肽表位竞争结合测定;基于 A204 细胞的测定;体内测定)。

[0108] 术语“交叉阻断(cross-block)”、“交叉阻断的(cross-blocked)”和“交叉阻断(cross-blocking)”在本文中可互换地使用以指抗体或其它结合剂干扰其它抗体或结合剂与 ActRIIA 结合的能力。

[0109] 可使用竞争结合测定来确定抗体或其它结合剂能够干扰另一种抗体或其它结合剂与 ActRIIA 结合的程度,以及因此确定它是否可根据本发明被称作交叉阻断。一个特别适合的定量测定使用 BIACORE™仪器,其可利用表面等离子体共振技术来测量相互作用程度。实施例 4 提供了用于进行基于 BIACORE™的交叉阻断测定的方法。另一种适合的定量交叉阻断测定使用基于 ELISA 的方法来测量抗体或其它结合剂之间在与 ActRIIA 结合方面的竞争。

[0110] 下面一般地描述了用于确定抗体或其它结合剂是否交叉阻断或者是否能够根据本发明进行交叉阻断的适合的 BIACORE™测定。为了方便,提及两种抗体,但应当理解,该测定可与本文所述的任一种 ActRIIA 结合剂一起使用。按照制造商的推荐,运行 BIACORE™仪器(例如 BIACORE™ 3000)。

[0111] 因此,在一个交叉阻断测定中,用预先连接的抗-mFc IgG 将 ActRIIA-mFc 融合蛋白捕获在 CM5 BIACORE™芯片上,以产生 ActRIIA 包被的表面。通常,将 200-800 个共振单位的 ActRIIA-mFc (二聚体)与芯片偶联(该量会提供容易测量的水平的结合,但可被所用的测试试剂的浓度容易地饱和)。

[0112] 待评估它们互相阻断的能力的两种抗体(被称作 A* 和 B*)以一比一的摩尔比例的结合位点在适合的缓冲液中混合以产生测试混合物。当在结合位点的基础上计算浓度时,抗体的分子量被假设为抗体的总分子量除以该抗体上 ActRIIA 结合位点的数量。

[0113] 测试混合物中每种抗体的浓度应该是足够高以容易地使捕捉在 BIACORE™芯片上的 ActRIIA-mFc 分子上该抗体的结合位点饱和。混合物中的抗体具有相同的摩尔浓度(在结合基础上)而且该浓度将通常是在 1.00 和 1.5 微摩尔之间(在结合位点的基础上)。

[0114] 还制备了含有单独的抗体 A* 和单独的抗体 B* 的不同溶液。这些溶液中的抗体 A* 和抗体 B* 应该在与测试混合物相同的缓冲液中并且是相同的浓度。

[0115] 使测试混合物在 ActRIIA-mFc 包被的 BIACORE™芯片上通过,并且记录结合总量。然后以除去结合的抗体而不破坏芯片结合的 ActRIIA-mFc 的方式处理芯片。通常,通过用 30 mM 的 HCl 处理芯片 60 秒来将其完成。

[0116] 然后使单独的抗体 A* 的溶液在 ActRIIA-mFc 包被的表面上通过,并且记录结合量。再次处理芯片以除去所有的结合抗体而不破坏芯片结合的 ActRIIA-mFc。

[0117] 然后使单独的抗体 B* 的溶液在 ActRIIA-mFc 包被的表面上通过, 并且记录结合量。

[0118] 接下来计算了抗体 A* 和抗体 B* 的混合物的最大理论结合, 而且它是当单独在 ActRIIA 表面上通过时每种抗体的结合的和。如果实际记录的混合物结合少于该理论最大值, 那么这两种抗体互相交叉阻断。

[0119] 因此, 通常, 根据本发明的交叉阻断抗体或其它结合剂为如下的抗体或结合剂: 在上述 BIACORE™交叉阻断测定中结合 ActRIIA, 以致于在测定期间和在本发明第二抗体或其它结合剂的存在下, 记录的结合是在组合在一起的两种抗体或结合剂的最大理论结合(如上刚刚定义的)的 80% 和 0.1% 之间(例如 80% 至 4%), 特别是在最大理论结合的 75% 和 0.1% 之间(例如 75% 至 4%), 而且更特别地是在最大理论结合的 70% 和 0.1% 之间(例如 70% 至 4%)。

[0120] 上述的 BIACORE™测定是被用来确定抗体或其它结合剂是否根据本发明互相交叉阻断的测定。在个别情况下, 特定的抗体或其它结合剂可能不结合经由抗-mFc IgG 偶联至 CM5 BIACORE™芯片的 ActRIIA-mFc (这通常发生在当 ActRIIA 上的相关结合位点被 ActRIIA 与 mFc 的连接遮蔽或破坏时)。在这样的情况下, 可使用标记形式的 ActRIIA (例如 C-端 His- 标记的 ActRIIA) 来确定交叉阻断。在该特定形式下, 抗-His 抗体将被偶联至 BIACORE™芯片, 然后使 His- 标记的 ActRIIA 在芯片表面上通过并被抗-His 抗体捕捉。基本上按照上述进行交叉阻断分析, 但是在每个芯片再生循环之后, 将新的 His- 标记的 ActRIIA 装载回用抗-His 抗体包被的表面上。此外, 本领域已知的各种其它标记和标记结合蛋白组合可被用于这样的交叉阻断分析(例如 HA 标记与抗-HA 抗体; FLAG 标记与抗-FLAG 抗体; 生物素标记与链霉抗生物素)。

[0121] 下面一般地描述了用于确定抗-ActRIIA 抗体或其它 ActRIIA 结合剂是否交叉阻断或者是否能够根据本发明交叉阻断的 ELISA 测定。为了方便, 提及两种抗体, 但应当理解, 该测定可与本文所述任一种 ActRIIA 结合剂一起使用。

[0122] 测定的一般原理是, 将抗-ActRIIA 抗体包被在 ELISA 板的孔上。将过量的潜在地交叉阻断性的第二抗-ActRIIA 抗体加入溶液中(即未结合 ELISA 板)。然后将有限量的 ActRIIA (或可替换地 ActRIIA-mFc) 加入孔中。包被的抗体和溶液中的抗体竞争对有限数量的 ActRIIA (或 ActRIIA-mFc) 分子的结合。将板冲洗, 以除去未被包被的抗体所结合的 ActRIIA, 并且还除去第二溶液相抗体以及第二溶液相抗体和 ActRIIA 之间形成的任何复合物。然后使用适合的 ActRIIA 检测试剂, 测量结合的 ActRIIA 的量。能够交叉阻断包被的抗体的溶液中的抗体, 将能够导致包被的抗体可结合的 ActRIIA 分子数量相对于不存在第二溶液相抗体时包被的抗体可结合的 ActRIIA 分子数量的减少。

[0123] 这里更详细地描述了有关 Ab-14E1 和理论抗体 Ab-XX 的测定。在 Ab-14E1 被选为固定化抗体的情况下, 将它包被在 ELISA 板的孔上, 之后用适合的阻断溶液将板阻断, 以使随后加入的试剂的非特异性结合最小化。然后将过量的 Ab-XX 加入 ELISA 板中, 使得每孔的 Ab-XX ActRIIA 结合位点的摩尔数比在包被 ELISA 板时每孔使用的 Ab-14E1 ActRIIA 结合位点的摩尔数高至少 10 倍。

[0124] 然后加入 ActRIIA, 使得每孔加入的 ActRIIA 的摩尔数比被用于包被每孔的 Ab-14E1 ActRIIA 结合位点的摩尔数低至少 25 倍。在适合的温育阶段之后, 冲洗 ELISA

板,并加入 ActRIIA 检测试剂,以测量被包被的抗-ActRIIA 抗体(在该情况下,Ab-14E1)所特异性结合的 ActRIIA 的量。测定的背景信号被定义为,在含有包被的抗体(在该情况下,Ab-14E1)、溶液相抗体(在该情况下,Ab-XX)、单独的 ActRIIA 缓冲液(即不含 ActRIIA)和 ActRIIA 检测试剂的孔中获得的信号。测定的阳性对照信号被定义为,在含有包被的抗体(在该情况下,Ab-14E1)、单独的溶液相抗体缓冲液(即不含溶液相抗体)、ActRIIA 和 ActRIIA 检测试剂的孔中获得的信号。ELISA 测定需要以这样的方式进行:使得阳性对照信号是背景信号的至少 3 倍。

[0125] 作为方法逻辑学伪像的对照,可以以刚才描述的形式运行交叉阻断测定,并且还反转,用 Ab-XX 作为包被的抗体,用 Ab-14E1 作为溶液相抗体。

[0126] 可以使用报道基因测定(利用 A204 横纹肌肉瘤细胞)来确定给定的抗-ActRIIA 抗体是否可以中和重组 ActRIIA 配体(诸如激活素 A 和激活素 B)对固有的 ActRIIA 的活化。在没有抗体存在下,这些 ActRIIA 配体可以剂量依赖性地刺激 A204 细胞中的 ActRIIA 信号传递。

[0127] 为了开始测定,以 10^5 个细胞/孔,将 A204 细胞(ATCC HTB-82)分布在 48-孔平板中。在次日,用主要报告质粒 pGL3(CAGA)12 (Dennler 等人, 1998, EMBO 17:3091-3100) 和 Renilla 报告质粒 pRLCMV(其用于控制转染效率)转染细胞。CAGA12 基序存在于 TGF- β 应答基因中,所以该载体对于通过 Smad2 和 Smad3 进行信号传递的因子具有普遍用途。将含有 10 μ g pGL3(CAGA)12、1 μ g pRLCMV、30 μ l Fugene 6 (Roche Diagnostics) 和 970 μ l OptiMEM (Invitrogen) 的溶液预温育 30 min,然后加入到 McCoy 氏生长培养基中,将其施用给铺板的细胞(500 μ l/孔),用于在室温温育过夜。在第 3 天,除去培养基,并将细胞与在含有 0.1% BSA 的磷酸盐缓冲盐水中稀释的试验物一起在 37 $^{\circ}$ C 温育(250 μ l/孔) 6 h。冲洗以后,用被动裂解缓冲液(Promega E1941)裂解细胞,并在 -70 $^{\circ}$ C 保存过夜。在第 4 天,将平板在轻轻摇振下温热至室温。将细胞裂解物一式两份地转移至化学发光板(96-孔),并用得自 Dual-Luciferase Reporter Assay 系统(Promega E1980)的试剂在光度计中分析,以确定标准化的荧光素酶活性。

[0128] 本文公开的抗体会结合人 ActRIIA 的区域(所述区域对于该蛋白的体内活性而言是重要的),从而抑制 ActRIIA 的活性。抗体与 ActRIIA 的结合,可以与生物标志物的变化相关联,所述生物标志物与 ActRIIA 介导的信号传递有关,例如循环的 FSH 浓度、具有激活素依赖性的肿瘤发生的动物的体重或恶病质标志物。

[0129] 可以测量依赖于 ActRIIA 信号传递的药效动力学参数,作为 ActRIIA 结合剂的体内试验的终点,以便鉴定能够中和 ActRIIA 并提供治疗益处的那些结合剂。这样的参数包括:切除卵巢的(OVX)雌性中的血清 FSH 浓度、瘦体重和脂肪含量,如在实施例中所示。中和 ActRIIA 的结合剂被定义为,与媒介物治疗的动物相比,能够造成这样的药效动力学参数的统计上显著的变化的结合剂。这样的体内试验可以在任意合适的哺乳动物(例如小鼠、大鼠、猴)中进行。

[0130] **3. 筛选测定和其它生化用途**

在某些方面,本发明涉及主题 ActRIIA 结合剂用于鉴定化合物(试剂)的用途,所述化合物是 ActRIIA 的激动剂或拮抗剂。可以试验通过该筛选鉴定出的化合物,以评估它们的在体内或在体外调节 ActRIIA 介导的信号传递的能力。例如,可以在动物模型中试验这些

化合物。

[0131] 多种测定形式可满足需要,然而根据本公开内容,本领域的普通技术人员可了解未在本文明确描述的测定形式。如本文所述,可通过任何组合化学方法产生本发明的试验化合物(试剂)。可替换地,主题化合物可以是体内或体外合成的天然存在的生物分子。待测定其起组织生长调节剂作用的能力的化合物(试剂)可通过例如细菌、酵母、植物或其它生物产生(例如天然产物)、以化学法产生(例如小分子,包括肽模拟物)或以重组法产生。本发明考虑的试验化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、肽模拟物、糖、激素和核酸分子。在一个具体的实施方案中,试验物质是有机小分子,分子量小于约 2,000 道尔顿。

[0132] 本发明的试验化合物可以单一的分散实体提供,或者以较复杂的文库提供,例如通过组合化学制备的文库。这些文库可包含例如醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚和有机化合物的其它类别。向试验系统中提供的试验化合物可呈分离形式或作为化合物的混合物,尤其在最初的筛选步骤中。任选化合物可任选用其它化合物衍生化并具促进化合物分离的衍生化基团。衍生化基团的非限制实例包括生物素、荧光素、洋地黄毒苷(digoxigenin)、绿色荧光蛋白、同位素、聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、可光活化的交联剂或其任何组合。

[0133] 在测试化合物文库和天然提取物的许多药物筛选程序中,需要高通量测定法以便在给定时间内使研究的化合物的数目最大化。在无细胞系统(例如可用纯化的或半纯化的蛋白质衍生)中进行的测定法,常常优选作为“初步”筛选,因为它们可被产生以允许快速显现和相对容易地检测由试验化合物介导的分子靶标中的改变。此外,在体外系统中一般可忽略试验化合物的细胞毒性或生物利用度的作用,测定法反而主要集中在药物对分子靶标的作用上,如可表现在 ActRIIA 结合剂和 ActRIIA 多肽之间结合亲和力的改变。

[0134] 仅举例来说,在本发明的示例性筛选测定法中,将目标化合物与通常能够与 ActRIIA 多肽结合的分离和纯化的 ActRIIA 结合剂(其适用于测定目的)接触。然后向化合物和 ActRIIA 结合剂的混合物中加入含有 ActRIIA 多肽的组合物。ActRIIA 多肽和 ActRIIA 结合剂之间的复合物的检测和定量会提供用于确定所述化合物的抑制(或增强)ActRIIA 多肽和 ActRIIA 结合剂之间的复合物形成的功效的手段。通过从使用不同浓度的试验化合物所得到的数据绘制剂量反应曲线,可以评价化合物的功效。此外,还可进行对照测定,以提供对比基线。例如,在对照测定中,将分离和纯化的 ActRIIA 结合剂加入含有 ActRIIb 多肽的组合物中,在没有试验化合物存在下,定量 ActRIIA 多肽和 ActRIIA 结合剂之间的复合物形成。应该理解,一般而言,可以改变可使反应物混合的顺序,并且可以同时混合。此外,可使用细胞提取物和裂解物替换经纯化的蛋白质,以提供合适的无细胞测定系统。

[0135] 通过多种技术,可以检测 ActRIIA 多肽和 ActRIIA 结合剂之间的复合物形成。例如,使用例如可检测地标记的蛋白质,例如放射性地标记的(例如, ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H)、荧光地标记的(例如, FITC)或酶法标记的 ActRIIA 多肽或 ActRIIA 结合剂,通过免疫测定法,或通过色谱检测,可以定量复合物形成的调节。

[0136] **4. 治疗剂的配制和递送**

提供了药物组合物,其包含上述的结合剂(诸如抗体 Ab-14E1 或其人源化形式)中的至少一种,以及药学上或生理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0137] 在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的适合的剂量和治疗方案的开发

是本领域众所周知的,包括例如皮下、口服、肠胃外、静脉内、鼻内和肌肉内施用和配制,其中的一些在下面为了一般性的说明目的而被简要讨论。

[0138] 在某些应用中,本文所公开的药物组合物可通过口服施用而被递送至动物。像这样,可以用惰性的稀释剂或可同化的可食用载体配制这些组合物,或者它们可被封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者它们可被压制成片剂,或者它们可被直接掺入饮食的食物中。

[0139] 在某些情况下,期望皮下、肠胃外、静脉内、肌肉内或甚至腹膜内递送本文所公开的药物组合物。这种方法是本领域技术人员众所周知的,其中的一些被进一步描述在例如美国专利号 5,543,158、美国专利号 5,641,515 和美国专利号 5,399,363 中。在某些实施方案中,作为游离碱或药学上可接受的盐的活性化合物的溶液可在与表面活性剂例如羟基丙基纤维素适当地混合的水中制备。还可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及油中制备分散体。在普通的储存和使用条件下,这些制剂通常将含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0140] 适合注射使用的示例性药物形式包括无菌的水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末(例如,参见美国专利号 5,466,468)。在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且必须是流体,达到存在容易的可注射性的程度。它在制造和储存条件下必须是稳定的,并且必须进行抗微生物例如细菌和真菌的污染活动的保存。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适合的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣例如卵磷脂,通过在分散体的情况下维持需要的粒度,和/或通过使用表面活性剂。可通过各种抗细菌和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来促进对微生物活动的预防。在许多情况下,将优选地包括等渗剂例如糖或氯化钠。可注射的组合物的延长吸收可由在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶所引起。

[0141] 在一个实施方案中,为了以水溶液进行肠胃外施用,如果必要则应该将溶液适当地缓冲,并且使用足够的盐水或葡萄糖将液体稀释剂首先变得等渗。这些特定的水溶液特别适合于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。在这一点上,可被使用的无菌含水介质是本领域技术人员根据本公开内容已知的。例如,可将一剂溶解在 1 ml 的等渗 NaCl 溶液中并且加入到 1000 ml 的皮下灌注液或注射到输液的提议位点(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第 15 版,第 1035-1038 和 1570-1580 页)。取决于被治疗的受试者的状况,剂量的一些改变将是必要的。此外,对于人体施用,制剂将当然优选地满足 FDA 生物制品标准办公室所要求的无菌性、热原性和一般的安全性以及纯度标准。

[0142] 在本发明另一个实施方案中,本文所公开的组合物可以以中性或盐形式配制。示例的药学上可接受的盐包括酸加成盐(由蛋白的游离氨基形成),其由诸如例如盐酸或磷酸的无机酸或诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成。由游离羧基形成的盐还可衍生自无机碱和有机碱,所述无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,所述有机碱诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。在配制之后,将以与剂量制剂相容的方式和治疗有效的量来施用溶液。

[0143] 载体还可包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。这种介质和试剂在药学生物活性物质上的使用是本领域众所周知的。除非在任何常规介质或试剂与活性成分不相容的情况下,它在治疗组合物中的用途被涵盖。还可将补充的活性成分掺入组合物。短语“药学上

可接受的”是指在施用于人不产生过敏或相似的不利反应的分子实体和组合物。

[0144] 在某些实施方案中,脂质体、纳米胶囊、微粒、脂颗粒、小泡等被用于将本发明的组合物引入适合的宿主细胞/生物体。特别地,本发明的组合物可被配制以用于封装在脂颗粒、脂质体、小泡、纳米球或纳米微粒或诸如此类中的递送。可替换地,本发明的组合物可共价地或非共价地结合这种载体媒介物的表面。

[0145] 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 等人, Indian J. Exp. Biol. 35(8):801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3):233-61, 1995; 美国专利号 5,567,434; 美国专利号 5,552,157; 美国专利号 5,565,213; 美国专利号 5,738,868 和美国专利号 5,795,587,每一个特别地通过引用整体并入本文)。在全身递送之后,脂质体的使用看上去不与自身免疫应答或不可接受的毒性相关。在某些实施方案中,从分散在含水介质中的磷脂形成脂质体并且自发地形成多层同心双层小泡(还被称作多层小泡(MLV))。

[0146] 可替换地,在其它实施方案中,本发明提供了本发明组合物的药学上可接受的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常可以以稳定的和可再现的方式将化合物包裹起来(参见,例如, Quintanar-Guerrero 等, Drug Dev. Ind. Pharm. 24(12): 1113-28, 1998)。为了避免由于细胞内聚合物过载所致的副作用,可以使用能够在体内降解的聚合物来设计这种超细的颗粒(尺寸约 0.1 μm)。可根据例如 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; 和美国专利号 5,145,684 中所述来制备这种颗粒。

[0147] 此外,本发明的药物组合物可与包装材料一起置于容器中,所述包装材料提供关于这种药物组合物使用的说明书。通常,这种说明书将包括描述试剂浓度以及在某些实施方案中对于重构药物组合物可能必要的赋形剂成分或稀释剂(例如水、盐水或 PBS)的相对量的明确说明。

[0148] 施用的剂量范围可以从 0.01 mg/kg 至 200 mg/kg 体重。然而,对于本领域技术人员将明显的是,施用的量和频率当然将取决于一些因素例如被治疗的适应症的性质和严重性、期望的应答、患者的状况等等。通常,可通过上述各种技术施用组合物。

[0149] 5. ActRIIA 结合剂的治疗用途

在某些实施方案中,本发明的 ActRIIA 结合剂可以用于治疗或预防与 ActRIIA 和/或 ActRIIA 配体(例如,激活素 A、GDF8 或 GDF11)的异常活性有关的疾病或病症。这些疾病、障碍或病症在本文中通常被称作“ActRIIA 相关的病症”。在某些实施方案中,本发明提供了治疗或预防有此需要的个体的疾病、障碍或病症的方法,其中给所述个体施用治疗有效量的如上所述的 ActRIIA 结合剂。这些方法的特殊目的在于,治疗性地和预防性地处理动物,更具体地是人类。

[0150] 本公开内容提供了用于治疗有此需要的个体的病症或障碍的方法和组合物,其中给所述个体施用治疗有效量的 ActRIIA 结合剂,例如,针对 ActRIIA 的中和抗体。具有抑制

素 α 亚基遗传缺陷的小鼠是抑制素 A 和抑制素 B 缺陷型,这会导致过表达激活素 A 和 B 的性腺肿瘤 (Matzuk 等人, 1992, Nature 360:313-319; Matzuk 等人, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:8817-8821)。所有这样的小鼠会发展这些肿瘤,并最终死于由高水平的肿瘤衍生的激活素(其通过 ActRIIA 起作用)介导的癌症恶病质样综合征 (Coerver 等人, 1996, Mol Endocrinol 10:534-543)。尽管不希望限制本发明,针对 ActRIIA 的中和抗体可用于:治疗产生激活素的肿瘤的作用、减轻激活素介导的恶病质、和延长患者存活期,如本文中关于抑制素缺陷型小鼠所证实的(参见实施例)。

[0151] **ActRIIA** 和 ActRIIA- 配体复合物在组织生长以及早期发育过程(诸如不同结构的正确形成)中或者在一种或多种发育后能力(包括性发育、垂体激素产生以及骨和软骨的建立)中起重要作用。因而,ActRIIA 相关的病症包括异常的组织生长和发育缺陷。另外,ActRIIA 相关的病症包括、但不限于细胞生长和分化障碍,诸如炎症、变态反应、自身免疫疾病、感染性疾病和肿瘤。

[0152] 示例性的 ActRIIA 相关的病症包括神经肌肉障碍(例如,肌营养不良和肌肉萎缩)、充血性阻塞性肺疾病或肺气肿(和有关的肌肉消瘦)、肌肉消瘦综合征、少肌症、恶病质、脂肪组织障碍(例如,肥胖)、II 型糖尿病和骨退行性疾病(例如,骨质疏松症)。其它示例性的 ActRIIA 相关的病症包括肌肉变性障碍和神经肌肉障碍、组织修复(例如,伤口愈合)、神经变性疾病(例如,肌萎缩性侧索硬化)、免疫学障碍(例如,与淋巴细胞的异常增殖或功能相关的障碍)和肥胖症或与脂肪细胞的异常增殖相关的障碍。

[0153] 在某些实施方案中,本发明的 ActRIIA 结合剂被用作肌营养不良治疗的组成部分。术语“肌营养不良”是指一类变性性肌肉疾病,其特征在于骨骼肌以及有时的心肌和呼吸肌的逐渐弱化和衰退。肌营养不良是遗传病症,其特征在于从微观肌肉变化开始的进行性肌肉消瘦和衰弱。当肌肉随时间退化时,人的肌肉强度下降。可用包括主题 ActRIIA 结合剂的方案治疗的示例性的肌营养不良包括:杜兴肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)、埃-德二氏肌营养不良(EDMD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、面肩肱型肌营养不良(FSH 或 FSHD)(也被称作 Landouzy-Dejerine)、肌强直性肌营养不良(MMD)(也被称作斯太纳特病)、眼咽肌营养不良(OPMD)、远端肌营养不良(DD)、先天性肌营养不良(CMD)和肩肱肌营养不良(SMD)。

[0154] 法国神经学家 Guillaume Benjamin Amand Duchenne 在十九世纪六十年代首次描述了杜兴肌营养不良(DMD)。贝克肌营养不良(BMD)以德国医生 Peter Emil Becker 命名,他在二十世纪五十年代首次描述了 DMD 的这种变体。DMD 是男性中最常见的遗传疾病之一,影响 1/3,500 个男孩。当位于 X 染色体短臂上的肌养蛋白基因断裂时,发生 DMD。由于男性只携带一个拷贝的 X 染色体,因此只有一个拷贝的肌养蛋白基因。在无肌养蛋白的情况下,在收缩和松弛循环期间,肌肉容易受损。虽然在疾病早期肌肉通过再生来补偿,但以后肌肉祖细胞无法跟上继续进行的损害,而且健康的肌肉被无功能的纤维脂肪组织代替。

[0155] **BMD** 由肌养蛋白基因的不同突变引起。BMD 患者具有一些肌养蛋白,但或是量不足,或是品质低下。具有一些肌养蛋白保护 BMD 患者的肌肉不像患有 DMD 的人的肌肉那样严重地或快速地变性。

[0156] 例如,研究表明,在体内阻断或消除 GDF8(一种 ActRIIA 配体)的功能可有效治疗

DMD 和 BMD 患者中的至少某些征状。因此,主题 ActRIIA 结合剂可用作 GDF8 抑制剂(拮抗剂),并构成在 DMD 和 BMD 患者中在体内阻断 GDF8 和 / 或 ActRIIA 的功能的替代方法。

[0157] 在其它实施方案中,ActRIIA 结合剂也可以用于治疗或预防由肌病引起的肌萎缩,所述肌病的实例包括炎症性肌病、代谢性肌病和肌强直。主题 ActRIIA 结合剂可用于治疗先天性肌病,诸如肌管性肌病、线状体肌病和线粒体肌病。主题 ActRIIA 结合剂可以用于治疗包涵体肌炎、肌红蛋白尿、横纹肌溶解、骨化性肌炎、多肌炎或皮炎。另外,ActRIIA 结合剂可以治疗或预防由糖皮质激素治疗、少肌症、长期卧床休息、骨骼固定、脓毒症或充血性心力衰竭引起的肌肉萎缩。

[0158] 在需要肌肉生长的其它神经肌肉疾病或病症中,主题 ActRIIA 结合剂会提供增加肌肉量的有效方法。例如,肌萎缩性侧索硬化(ALS,也被称作 Lou Gehrig 氏病或运动神经元疾病)是一种慢性、无法治愈和无法停止的攻击运动神经元(连接脑与骨骼肌的 CNS 组分)的 CNS 病症。在 ALS 中,运动神经元恶化,并最终死亡,尽管人脑正常地保持完整功能和警觉,但运动指令从不到达肌肉。患上 ALS 的大多数人年龄介于 40-70 岁之间。最早弱化的运动神经元是通向臂或腿的运动神经元。ALS 患者可能行走困难,他们可能掉东西、摔倒、言语含糊,并且控制不住地笑或哭。最终,四肢肌肉因废用而萎缩。这种肌肉衰弱会使人变得虚弱,患者将需要轮椅或变得不能下床活动。大多数 ALS 患者从发病起 3-5 年内死于呼吸衰竭或死于呼吸机辅助型并发症如肺炎。ActRIIA 结合剂对其可能有用的其它神经肌肉疾病包括:由脊髓损伤或中风引起的麻痹;由创伤或变性的、代谢性的或炎症性的神经病引起的失神经支配;成年人运动神经元疾病;具有多病灶导体阻断的自身免疫性运动神经病;和幼儿或青少年脊髓性肌萎缩。

[0159] 由 ActRIIA 结合剂诱导的肌肉量增加还可能有益于患有肌肉消瘦疾病的人。Gonzalez-Cadavid 等人(1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14938-43)报道,GDF8 表达与人的无脂肪质量反相关,而 GDF8 基因表达的增加与患有 AIDS 消耗综合征的男性的体重减轻有关。通过抑制 AIDS 患者的 GDF8 功能,可以缓解 AIDS 的至少某些征状(如果不是完全消除的话),因此显著改善 AIDS 患者的生命质量。

[0160] 癌症厌食-恶病质综合征属于癌症最使人虚弱和危及生命的方面。癌症厌食-恶病质综合征中的进行性体重减轻是许多癌症类型常见的特征,不仅仅是造成生命质量差和对化学治疗的反应差的原因,而且还是造成生存时间比患有类似肿瘤却无体重减轻的患者的生存时间短的原因。与厌食、脂肪和肌肉组织消耗、心理苦恼和生命质量低下有关,恶病质是由癌症和宿主间的复杂相互作用引起的。它是癌症患者死亡最普遍的原因之一,存在于 80% 的死亡中。它是影响蛋白质、碳水化合物和脂肪代谢的代谢障碍的复杂实例。肿瘤产生直接和间接异常情况两者,导致厌食和体重减轻。目前,没有控制或逆转该进程的治疗方法。癌症厌食-恶病质综合征影响细胞因子产生、脂质动员和蛋白酶解诱导因子的释放以及中间代谢的改变。虽然厌食普遍存在,但仅食物摄取降低不能解释见于癌症患者中的身体组成的改变,而且营养摄取增加不能逆转消耗综合征。如果在 6 个月时间内发生的非有意的体重减轻超过发病前体重的 5%,则通常怀疑癌症患者有恶病质。

[0161] 由于发现了成年小鼠中 GDF8 的全身性过量表达会诱导类似于在人恶病质综合征中观察到的严重肌肉和脂肪丧失(Zimmers 等人, 2002, Science 296:1486-1488),主题 ActRIIA 结合剂作为药物组合物可有益地用于预防、治疗或减轻其中需要肌肉生长的恶病

质综合征的症状。这包括与癌症有关的恶病质以及与类风湿性关节炎有关的恶病质。

[0162] 在某些实施方案中,本发明提供了在有此需要的个体中减少或抑制 FSH 分泌的方法,其中给所述个体施用治疗有效量的 ActRIIA 结合剂,例如,针对 ActRIIA 的中和抗体。男性中 FSH 的正常值在 2 - 18 mIU/ml 血液的范围内。女性中 FSH 的正常值在 5 -25 mIU/mL 的范围内。健康女性中高于 50 mIU/mL 的水平与绝经相关。通过检测唾液 (eMHP™) 可确定 FSH 的组织浓度。

[0163] 在某些实施方案中,本发明提供了在有此需要的个体中治疗或预防前列腺癌的方法,其中给所述个体施用治疗有效量的 ActRIIA 结合剂,例如,针对 ActRIIA 的中和抗体,以便减少或抑制 FSH 分泌。这些方法可用于对具有发展前列腺癌的高风险的人(尤其是男性)的治疗性和预防性处理。由于每一位男性都处于发展前列腺癌的风险中,具有发展前列腺癌的高风险的男性是,与普通人群或处于某年龄组的男性人群相比,其风险因素赋予更大发展该病可能性的男性。示例性的风险因素包括年龄、家族史或遗传构成、生活方式习惯(例如锻炼和饮食)、以及暴露于辐射或其它致癌剂。

[0164] 术语“治疗前列腺癌”是指,相对于未治疗对照或相对于治疗前疾病的严重性,对该疾病一种或多种症状或特征的改善。该术语并不必然地要求接受治疗的患者痊愈或者该疾病从患者完全根除。治疗前列腺癌的药剂可以是减轻该疾病一种或多种症状或特征严重性的药剂。请注意肿瘤生长与进展受多种因素影响,包括细胞周期进展与细胞分裂的介体、以及细胞死亡或凋亡的调节因子。因此,治疗前列腺癌可涉及癌细胞增殖减少或细胞分裂速率减少。可替换地或额外地,治疗前列腺癌可涉及癌细胞存活减少或凋亡增加。因此,在某些实施方案中,治疗前列腺癌可涉及细胞分裂减少和细胞死亡增多。不考虑机制,治疗前列腺癌的药剂的有效性可通过可观察的标准确定,例如比对照更少数量的癌细胞(由于增殖减少、凋亡增加、或两者)、或比对照减小的肿瘤尺寸。所以治疗前列腺癌或者抑制肿瘤或癌细胞生长预期与导致如此变化发生的机制无确定关联。预防和治疗都可在医生或其它卫生保健提供者所提供的诊断和施用治疗药剂预期效果的分析中得到阐明。

[0165] 当观察主题拮抗剂对人类的前列腺癌进展的效果时,通过可测量的疾病的减少或消失、和 / 或没有新病变、或防止转移,可以评价效果。例如,ActRIIA 结合剂可显著地减少或延迟患有非侵袭性和侵袭性前列腺癌的患者的前列腺癌进展。此外,所述试剂可在具有该疾病风险因素的健康男性中预防或降低发展前列腺癌的风险。这些试剂还可在具有该病史的患者中降低前列腺癌复发的风险。

[0166] 因此,ActRIIA 结合剂可用于在被认为有风险罹患该疾病的个体中预防或延迟前列腺癌的发生,并且该拮抗剂可用于选定的患者人群。合适的患者人群的实例包括具有前列腺癌家族史的患者,例如父亲或兄弟已被诊断患有该疾病的男性患者。在一种实施方案中,用 ActRIIA 结合剂治疗被认为具有高度风险罹患前列腺癌但尚未诊断患有该疾病的患者。该治疗可在该患者年龄到达 30、40、50、60、或者 70 岁时开始。

[0167] 本文公开的 ActRIIA 结合剂,尤其是抗 -ActRIIA 抗体,可用于治疗或预防患者的前列腺癌,包括患实体瘤的患者以及患转移性癌症的患者。ActRIIA 结合剂也可施用给具有下列症状的人受试者:前列腺的癌前病变或良性病变,或者任何异常的增生性病变,包括典型增生、非典型增生,以及非侵袭性癌或原位癌。本公开内容的拮抗剂还可用于治疗或预防激素依赖性的或激素应答性的癌症和非激素依赖性的癌症(例如激素不应性的前列腺癌)。

ActRIIA 结合剂可证实在表达水平升高(相对于来源于正常前列腺组织衍生的细胞)的激活素(例如 A、AB 或 B) 或者水平升高的 ActRIIA 的肿瘤中尤其有用。

[0168] 在某些实施方案中,本发明提供了在患有 FSH 分泌型垂体瘤的个体中减少或抑制 FSH 分泌的方法,通过给所述个体施用治疗有效量的 ActRIIA 结合剂,例如,抗 -ActRIIA 抗体。抑制这些垂体瘤中 FSH 的过多分泌,可用作减少肿瘤征状(诸如雌激素水平增加和发展卵巢囊肿)的治疗。本发明方法优选地与常规癌症疗法(诸如外科手术)联合使用,然而,单独地抑制 FSH 分泌可能是有效的治疗,尤其是在禁忌用外科手术或辐射的情况下。抗 -ActRIIA 抗体还可以用于治疗患有卵巢过度刺激综合征的患者。

[0169] 本发明意识到,通过使用主题结合剂,可以增强常规癌症疗法(例如,化学疗法、辐射疗法、光疗、免疫疗法和外科手术,尤其是前列腺切除术)的有效性。因此,ActRIIA 结合剂可用于治疗、预防、或控制前列腺癌的联合疗法中。所述结合剂可以与辐射和 / 或外科手术治疗、以及细胞毒性化学疗法和 / 或内分泌疗法联合地施用给患者。这样的联合疗法可协同作用,并允许减少每个单独疗法的剂量,由此减少每个疗法在高剂量时出现的有害副作用。在其它情况下,某一疗法难以治疗的恶性肿瘤可对两个或多个不同疗法组成的联合疗法有应答。因此,本公开内容涉及 ActRIIA 结合剂与另一种常规抗肿瘤剂同时或先后联合施用,以便增强该抗肿瘤剂的疗效或克服对该抗肿瘤剂的细胞抗性。本公开内容还涉及与激素疗法联合施用 ActRIIA 结合剂。ActRIIA 结合剂还可用于联合治疗中,以减少由 FSH 分泌型垂体瘤引起的征状。仅为阐述目的,可用于联合抗肿瘤疗法的药物化合物包括:氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、天门冬酰胺酶、卡介苗、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、喜树碱(camptothecin)、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、秋水仙碱、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔红霉素、己烯雌酚、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌二醇、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、染料木素、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、伊立替康、依罗替康(ironotecan)、来曲唑、亚叶酸、亮丙立德、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、卟菲尔钠(porphimer)、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、舒拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二氯环戊二烯钛(titanocene dichloride)、托泊替康、曲妥单抗(trastuzumab)、维 A 酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0170] 这些化疗抗肿瘤化合物可基于其作用机制分为例如如下各组:抗代谢物 / 抗癌剂,例如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸盐(folate)拮抗剂和相关抑制剂(巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和 2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖 / 抗有丝分裂剂,包括天然产物,例如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨),微管破坏剂例如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本、表二鬼臼毒素(epididodophyllotoxins)(鬼依托泊苷、替尼泊苷)、DNA 损伤剂(放线菌素、安吡啶、葱环类、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺(cytosan)、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲蜜胺奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、美录瑞塔明(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、

丙卡巴肼、泰素、泰索帝、替尼泊昔、三亚乙基硫代磷酸胺和依托泊昔(VP16))；抗生素，例如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、葱环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素；酶类(L-天冬酰胺酶，其全身性代谢L-天冬酰胺，并清除不能自己合成天冬酰胺的细胞)；抗血小板剂；抗增殖/抗有丝分裂烷化剂，例如氮芥类(氮芥、环磷酰胺及其类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、氮丙啶和甲基三聚氰胺类(六甲三聚氰胺和塞替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲类(卡莫司汀(BCNU)及其类似物、链脲菌素)、曲嗪类(trazenes)-达卡巴嗪(DTIC)；抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物，例如叶酸类似物(甲氨蝶呤)；铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特；激素类、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑)；抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和其它凝血酶抑制剂)；纤维蛋白溶解剂(例如组织纤蛋白溶解酶原激活物、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗；抗转移剂；抗分泌剂(布雷韦林)(breveldin)；免疫抑制剂(环孢素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、麦考酚酸酯)；抗血管形成化合物(TNP-470、染料木素)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂)；血管紧张素受体阻断剂；一氧化氮供体；反义寡核苷酸；抗体(曲妥珠单抗)；细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维A酸)；mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、恩尼泊昔(eniposide)、表柔比星、依托泊昔、伊达比星和米托蒽醌、托泊替康、伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松和泼尼松龙)；生长因子信号转导激酶抑制剂；线粒体机能障碍诱导剂和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶活化剂；以及染色质破坏剂。

[0171] 在某些实施方案中，可用于联合疗法的药物化合物包括抗血管生成剂，例如(1)“血管生成分子”的释放抑制剂，诸如VEGF或bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)；(2)血管生成分子的中和剂，例如抗- β bFGF抗体；以及(3)内皮细胞对血管生成刺激应答的抑制剂，包括胶原酶抑制剂、基膜更新抑制剂、血管生成抑制类固醇(angiostatic steroids)、源于真菌的血管生成抑制剂、血小板因子4、血小板反应蛋白、关节炎药物，例如D-青霉胺和硫代苹果酸金、维生素D3类似物、 α 干扰素等等。关于另外提议的血管生成抑制剂，参见Blood等人，Bioch. Biophys. Acta., 1032:89-118 (1990)，Moses等人，Science, 248:1408-1410 (1990)，Ingber等人，Lab. Invest., 59:44-51 (1988)，和美国专利号5,092,885, 5,112,946, 5,192,744, 5,202,352, 和6573256。此外，有多种化合物可用于抑制血管生成，例如，阻断VEGF介导的血管生成途径的肽或试剂、内皮抑制素蛋白或其衍生物、制管张素的赖氨酸结合片段、黑色素或促黑色素化合物、血纤蛋白溶解酶原片段(例如血纤蛋白溶解酶原的Kringles 1-3)、肌钙蛋白(tropoin)亚基、玻连蛋白 $\alpha v \beta 3$ 的拮抗剂、源自皂化蛋白B的肽、抗生素或其类似物(例如四环素或新霉素)、包含地诺孕素的组合物、包含偶联至肽的MetAP-2抑制核心的化合物、化合物EM-138、查耳酮及其类似物、N-乙酰基化 α -连接的酸性二肽酶(naaladase)抑制剂。参见，例如，美国专利号6,395,718、6,462,075、6,465,431、6,475,784、6,482,802、6,482,810、6,500,431、6,500,924、6,518,298、6,521,439、6,525,019、6,538,103、6,544,758、6,544,947、6,548,477、6,559,126和6,569,845。

[0172] 取决于联合疗法的性质，可在其它疗法正在施用时和/或之后，继续施用本发明

的治疗性 ActRIIA 结合剂。本文所述的结合剂可以以单次剂量或多次剂量施用。在一些情况下,在常规疗法之前至少数天开始施用结合剂,而在另外的情况下,在即将施用常规疗法之前或在施用常规疗法时开始施用。

[0173] 本申请的一个方面提供对生育力有用的方法和组合物。通过施用 ActRIIA 结合剂减少或抑制 FSH 分泌是抑制精子成熟的有用方法。在女性中,FSH 的减少能够限制卵巢中卵泡颗粒细胞的增殖。通过施用 ActRIIA 结合剂减少或抑制 FSH 分泌是避孕的有用方法。FSH 减少还可以延迟卵巢内卵泡的成熟,从而推迟女性中有限数目的卵泡的成熟。这种治疗具有增加自然受精可能性和在生命中较晚怀孕可能性的潜力。通过减少 FSH 分泌而延迟卵巢内卵泡的成熟还可用于防止卵母细胞耗竭(化疗或设计用于快速治疗分裂中的细胞的类似治疗的常见副作用)。

[0174] 本发明还提供了新组合物,其包含与一种或多种避孕剂相组合的一种或多种 ActRIIA 结合剂。示例性避孕剂包括雌激素、孕激素、黄体酮(例如异炔诺酮、炔诺酮、诺孕酯、炔诺孕酮、左炔诺孕酮、甲羟孕酮和去氧孕烯)、奥美昔芬(星克罗曼)。

[0175] 在某些实施方案中,本发明提供了在有此需要的个体中治疗或预防雌激素相关障碍的方法,其中给所述个体施用治疗有效量的 ActRIIA 结合剂,例如,针对 ActRIIA 的中和抗体,以减少或抑制 FSH 分泌。由于 FSH 对雌激素合成的控制功能,FSH 分泌的减少还可能有效治疗雌激素相关障碍,诸如子宫肌瘤、子宫内膜异位、多囊卵巢病、功能失调性子宫出血和卵巢癌。

[0176] 实施例

现在一般性描述本发明,通过参照下述实施例会更容易理解本发明,包括的实施例仅仅用于解释本发明的某些实施方案的目的,无意限制本发明。

[0177] 实施例 1. 单克隆抗体的制备

针对 ActRIIA (ACVR2A) 的抗体由于该受体在物种之间的高度序列保守性而难以制备。申请人使用不同的基于 ActRIIA 的免疫原对 A/J、BALB/c 和 Swiss Webster 品系的小鼠进行了集中的免疫接种方案,但是这些尝试都没有产生抗体。

[0178] 为了克服该困难,申请人使用人 ActRIIA 抗原构建体来免疫具有 ActRIIA 基因中的无效突变的小鼠。Acvr2a^{-/-} 小鼠 (C57BL/6Acvr2a^{tm1Zuk}) 具有降低的生存力,20-30% 的小鼠由于颅面骨畸形而在围产期死亡 (Matzuk 等人, 1995, Nature 374:356-360)。纯合的雄性小鼠是能育的,而纯合的雌性小鼠是不育的。重要的是,足够的 Acvr2a^{-/-} 小鼠存活至成年期,以允许它们用于制备针对人 ActRIIA 受体的单克隆抗体。因此,在有完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂或磷酸盐缓冲盐水存在下,用与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 或卵清蛋白 (OVA) 缀合的下述人 ActRIIA-His 序列皮下地免疫 (25μg/ 小鼠) 8 只雄性和 8 只雌性 Acvr2a^{-/-} 小

SGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNIS
鼠。GSIEIVKQGCWLDIDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPE
MEVTQPTSNPVTTPKPPHHHHH* (SEQ ID NO: 3)

[0179] 在免疫接种后大约 10 天收集血液,使用 ActRIIA-Fc 作为抗原通过间接 ELISA 确定抗-ActRIIA 抗体的效价。基于该筛选,一只免疫的 Acvr2a^{-/-} 小鼠接受第二次施用 (i. p.) 的 ActRIIA-His-KLH (50μg/ 小鼠) 以及抗-CD40 单克隆抗体 (10μg/ 小鼠)、CD40 激动剂,

以促进 B- 细胞活化。3 天后,取出脾,并通过标准方法使 B 细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合,以得到杂交瘤。基于针对总结合性能 (ELISA)、解离速率 (BIACORE™测定) 和中和潜力 (基于细胞的报道基因测定) 的筛选,鉴定有希望的杂交瘤克隆。在 2 轮杂交瘤亚克隆以后,选择抗体候选物 14E1.H8.H1 (Ab-14E1) 用于测序、纯化和进一步表征。

[0180] 实施例 2. Ab-14E1 序列

为了分析根据本发明生产的抗体的结构,从生产抗 -ActRIIA 单克隆抗体的杂交瘤中克隆了编码重链和轻链可变区的核酸。用 QIAshredder (Qiagen) 匀浆系统和 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen),从大约 4×10^6 个细胞/杂交瘤制备信使 RNA。使用 Advantage RT PCR Kit (Clontech) 合成第一链 cDNA,然后将其与 Advantage-HF 2 PCR Kit (Clontech) 和简并引物组联合使用 (参见 Zhou 等人, 1994, Nucl Acids Res 22:888),以执行 PCR 扩增。

[0181] 通过琼脂糖凝胶和 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 纯化 PCR 反应产物。然后使用与恒定区互补的 3' PCR 引物,通过标准方法测定序列。Ab-14E1 的 VH 和 VL 氨基酸序列分别显示在图 1 和 2 中,对应的核苷酸序列分别显示在图 3 和 4 中。应当指出,在通过简并 PCR 引物进行克隆的过程中,将 4 个核苷酸置换引入 VH 的 N- 端附近,尽管如此,其产生了活性抗体。在最终的序列中调节这些核苷酸 (SEQ ID NO. 14, 位置 3、6、7 和 12 ;图 3),以适应已知的免疫球蛋白框架序列,这通过来自杂交瘤的纯化蛋白的 N- 端测序来确认。还应当指出,将沉默核苷酸置换引入在 VH (SEQ ID NO: 14, 位置 351 和 357 ;图 3) 和 VL (SEQ ID NO: 15 ;位置 312 和 315 ;图 4) 的 C 端附近,以建立用于克隆的限制位点。

[0182] 下面列出了 Ab-14E1 的 CDR 序列,其根据 Kabat 等人 (1987, Sequences of proteins of Immunological Interest, 美国卫生和人类服务部, NIH, 美国) 以及 Chothia 和同事 (Al-Lazikani 等人, 1997, J Mol Biol 273:927-948) 进行定义。

CDR-H1	YSITSGYYWN	(SEQ ID NO: 4)
CDR-H2	YISYDGSNNYNPSLIN	(SEQ ID NO: 5)
CDR-H3	YAYRNDVRFAY	(SEQ ID NO: 6)
CDR-L1	RASQDISNFLN	(SEQ ID NO: 7)
CDR-L2	FTSRLHS	(SEQ ID NO: 8)
CDR-L3	QQGNTLPWT	(SEQ ID NO: 9)

[0183] 通过蛋白 A 色谱法、透析、病毒过滤和缓冲液更换,从杂交瘤条件培养基中纯化出抗体蛋白。

[0184] 通过 N- 端测序,证实纯化的 VH 和 VL 蛋白的 N- 端分别为 DVQLQESSGPG (SEQ ID NO: 10) 和 DIQMTQTTS (SEQ ID NO: 11)。

[0185] 实施例 3. Ab-14E1 和 ActRIIA 之间的接触位点

为了鉴定在 Ab-14E1 中的决定特异性的残基 (SDR),通过对下述物质的 x- 射线结晶分析,定位 Ab-14E1 和人 ActRIIA 之间的接触位点 :a) 单独的 14E1 Fab, 和 b) 与 ActRIIA 细胞外结构域 (ECD) 形成复合物的 14E1 Fab。

[0186] 蛋白制备. 在含有 4 mM EDTA 和 10 mM 半胱氨酸的磷酸盐缓冲盐水中,以 100:1 (w/w) 的 Ab-14E1:木瓜蛋白酶,用活化的木瓜蛋白酶在 37°C 消化 Ab-14E1 持续 4 h,从而制

备 14E1 Fab 用于结晶。将消化的样品稀释 2 倍, 调至 pH 9.5, 并用 HiTrap Q Sepharose™ (GE Healthcare) 进行色谱法, 以分离 Fab 组分 (流穿), 然后用尺寸排阻色谱法对其进一步纯化。将纯化的 14E1 Fab 以 12 mg/ml 保存在含有 5 mM Tris (pH 8.0)、25 mM NaCl 和 2 mM EDTA 的溶液中。

[0187] 从融合蛋白制备 ActRIIA ECD 用于结晶, 所述融合蛋白由通过接头与 Fc 结构域连接的人 ActRIIA ECD 组成, 所述接头含有肠激酶切割位点。用肠激酶在 37°C 消化该融合蛋白过夜, 并用 MABSELECT™ (GE Healthcare) 色谱法除去 Fc 组分, 从而得到 ActRIIA ECD。然后用内切糖苷酶 H_f (New England Biolabs) 将 ActRIIA ECD 去糖基化, 用尺寸排阻色谱法纯化, 用羧肽酶 B 和 Y (在磷酸盐缓冲盐水中的 20:1 比例的 ActRIIA ECD:CPB/CPY, 在 37°C 温育过夜) 消化, 并用尺寸排阻色谱法再次纯化。为了制备蛋白复合物, 将纯化的 14E1 Fab 与纯化的 ActRIIA ECD 以 1:1.2 的比例混合, 并用尺寸排阻色谱法纯化最后 1 次。将纯化的 14E1 Fab 和 ActRIIA ECD 的复合物以 20.5 mg/ml 保存在含有 10 mM Tris (pH 8.0) 和 25 mM 氯化钠的溶液中。

[0188] 结晶方法. 在含有 15-25% 的聚乙二醇、盐 (诸如硫氰酸钾、硫酸钠、丙二酸盐或酒石酸钾钠) 且 pH 值在 5.5-8.5 范围内的条件下, 使 14E1 Fab 结晶。从在 20% 的聚乙二醇 3350、200 mM 硫酸钠和 100 mM 双-三丙烷 (pH 7.75) 中生长的晶体收集数据。将这些晶体转移进由 3:1 (v/v) 比例的结晶缓冲液和甘油组成的缓冲液中, 并在转移到 x-射线系统上之前在液氮中快速冷冻。

[0189] 在含有 7-15% 的聚乙二醇、1-15 mM 的氯化锌且 pH 值在 5.5 至 7.5 之间的条件下, 使 14E1 Fab 和 ActRIIA ECD 的复合物结晶。从在 8% 聚乙二醇 8000、8 mM 氯化锌和 100 mM HEPES (pH 7.00) 中生长的晶体收集数据。将这些晶体转移进含有 25% 乙二醇的结晶缓冲液中, 并在转移到 x-射线系统上之前在液氮中快速冷冻。

[0190] 结晶数据

得到了 14E1 Fab 以及 14E1 Fab 与 ActRIIA ECD 的复合物的下述结晶数据。

	14E1 Fab	14E1 Fab/ActRIIA ECD
空间群	P4 ₁ 2 ₁ 2	I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
晶胞尺寸		
a, b, c (Å)	107.30, 107.30, 96.53	75.47, 91.79, 140.61
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
分辨率 (Å)	1.90 (1.93-1.90)	2.91 (2.96-2.91)
R _{合并}	0.051 (0.309)	0.037 (0.171)
I/σI	38.2 (5.0)	24.7 (4.6)
完整性 (%)	99.8 (98.0)	91.0 (67.7)
冗余	7.6 (3.3)	3.4 (3.0)
精化		
分辨率 (Å)	1.90	2.95
R _{work} /R _{free}	0.178/0.219	0.207/0.288
原子数/B-因子	3668/25.44	4074/53.8
蛋白	3296/24.34	4028/52.61
水	372/35.28	46/32.2
R.m.s 偏差		
键长 (Å)	0.006	0.004
键角 (°)	1.061	0.847

[0191] 结构精化方法. 为了确定 14E1 Fab 的晶体结构, 申请人使用 PDB 结构 1FIG 作为分子替换建模的模型, 并象预期的那样得到了由一种 Fab 分子组成的单一溶液。将分别来自 PDB 结构 2A6D 和 1KEN 的同源 VL 和 VH 结构域叠加在对应的 1FIG 结构域上。替换放置的 VL 和 VH 结构域, 以建立新的 14E1 Fab 模型, 通过调节矛盾的序列区域来对其精化。重构 14E1 Fab 模型, 并用这些经过调节的序列进一步精化, 以产生优良的模型, 这通过最终的统计学进行评价 (参见上表)。

[0192] 为了确定 14E1 Fab 和 ActRIIA ECD 之间的复合物的晶体结构, 申请人使用 ActRIIA 的 14E1 结构和 PDG 2G00 结构作为分子替换的模型。象预期的那样, 得到由一种 ActRIIA 分子和一种 14E1 Fab 分子组成的单一溶液。然后重构 14E1 Fab 和 ActRIIA ECD 模型, 并精化以产生良好质量的模型, 这通过最终的统计学进行评价 (参见上表)。

[0193] 结构结果. 结晶分析揭示了 14E1 Fab 和 ActRIIA ECD 之间的大接触表面 (埋藏的表面积总计大约 2650 \AA^2), 所述接触表面与以前确定的在 ActRIIA 上的配体结合区广泛地重叠 (Greenwald 等人, 1999, Nat Struct Biol 6:18-22; Gray 等人, 2000, J Biol Chem 275:3206-3212; Allendorph 等人, 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:7643-7648)。通过软件分析 (Acta Cryst D50:760-763, 1994) 确定的在 14E1 Fab VH 中的与 ActRIIA 接触的具体氨基酸残基显示在图 5 中, 并且也和每个 VH 残基与单个 ActRIIA 残基发生的原子接触的数目一起列在下表中。在下表中, 相对于 3 个替代性的参考点定义在 VH 中的氨基酸位置: a) N-端天冬氨酸残基; b) 重新定义为位置 0 的第一个半胱氨酸残基 (C1, 位置 22); 或 c) 重新定义为位置 0 的第二个半胱氨酸残基 (C2, 位置 96)。在下表中的 ActRIIA ECD 残基的编号与在图 6 中相同, 其显示了在 ActRIIA ECD 序列 (SEQ ID NO: 16) 内的与 VH 接触的 ActRIIA 残基的分布。

14E1 Fab VH 残基				ActRIIA ECD 残基	原子接触 的数目
氨基酸	位置	N-端=1	第 1 个 Cys=0		
Val	2		-20	-94	Asp 34 11 Asp 36 1
Gly	26		4	-70	Asp 34 5
Tyr	27		5	-69	Tyr 32 7 Gly 33 21 Asp 34 25
Ser	31		9	-65	Tyr 32 13
Gly	32		10	-64	Tyr 32 10
Tyr	33		11	-63	Tyr 32 6 Gly 33 13 Asp 34 19
					Lys 37 1 Leu 61 2
Tyr	34		12	-62	Glu 29 2
Tyr	54		32	-42	Pro 30 4 Tyr 32 14
Asn	59		37	-37	Asp 21 1 Arg 22 3
Ala	100		78	4	Tyr 32 1 Leu 61 4
Tyr	101		79	5	Glu 29 12 Pro 30 2 Cys 31 20 Tyr 32 13 Gly 33 2 Arg 39 9 His 40 1 Cys 59 34 Trp 60 13 Leu 61 12
Arg	102		80	6	Phe 13 8 Arg 22 2 Thr 23 9 Glu 29 11
Asn	103		81	7	Phe 13 15 Phe 14 7 Asn 15 15 Asp 21 1 Glu 29 2 Phe 42 10 Lys 56 30 Gln 57 13 Gly 58 3 Trp 60 2
Asp	104		82	8	Phe 42 1 Cys 59 6 Trp 60 22 Leu 61 11
Arg	106		84	10	Trp 60 15 Leu 61 27 Asp 62 10 Asp 63 4
Ala	108		86	12	Leu 61 1
Tyr	109		87	13	Asp 34 6 Lys 37 8

[0194] 在 14E1 Fab VL 中的与 ActRIIA 接触的具体氨基酸残基显示在图 7 中,并且也和每个 VL 残基与单个 ActRIIA 残基发生的原子接触的数目一起列在下表中。在下表中,相对于 3 个替代性的参考点定义在 VL 中的氨基酸位置:a) N-端天冬氨酸残基;b) 重新定义为位置 0 的第一个半胱氨酸残基(C1, 位置 23);或 c) 重新定义为位置 0 的第二个半胱氨酸

残基 (C2, 位置 88)。在下表中的 ActRIIA ECD 残基的编号与在图 8 中相同,其显示了在 ActRIIA ECD 序列 (SEQ ID NO: 16) 内的与 VL 接触的 ActRIIA 残基的分布。

14E1 Fab VL 残基				ActRIIA ECD 残基	原子接触 的数目
氨基酸	位置	N-端=1	第 1 个 Cys=0		
Asp	28	5	-60	Lys 46	4
Ser	30	7	-58	Lys 46	4
				Val 55	3
				Val 81	11
Asn	31	8	-57	Glu 80	1
				Val 81	9
Phe	32	9	-56	Phe 42	4
				Thr 44	9
				Val 55	3
				Lys 56	19
				Tyr 60	1
Tyr	49	26	-39	Trp 60	6
				Asp 62	3
				Asp 63	17
				Ile 64	4
Phe	50	27	-38	Thr 44	3
				Trp 60	6
				Val 81	3
				Phe 83	21
Ser	52	29	-36	Lys 76	1
Arg	53	30	-35	Trp 60	2
				Asp 63	14
				Asn 65	17
				Cys 66	1
				Lys 76	1
				Phe 83	21
				Cys 85	1
Leu	54	31	-34	Ile 64	2
Ser	56	33	-32	Lys 37	2
Ser	67	44	-21	Glu 80	1
Gly	91	68	3	Lys 56	4
Asn	92	69	4	Asn 17	13
				Asp 21	5
				Lys 56	10
Thr	93	70	5	Asn 17	6
				*Arg 20	4
				Asp 21	11
				Lys 56	1
Leu	94	71	6	*Arg 20	13
				Asp 21	12
Trp	96	73	8	Asp 21	5

[0195] * 用于对 14E1-ActRIIA 复合物建模的 ActRIIA 结构 (PDB 结构 2G00) 是基于,与人序列 (SEQ ID NO: 16) 相比具有在 ECD 位置 20 处的保守置换 (Lys 至 Arg) 的鼠序列;但是,任一个残基的侧链是无序的,且不会可察觉地影响所述复合物的总体结构。

[0196] 实施例 4. ActRIIA 结合和 Ab-14E1 的中和

申请人使用表面等离子体共振 (基于 BIACORE™的分析) 来确定纯化的 Ab-14E1 与人 ActRIIA 结合的动力学和亲和力。发现该抗体以大约 12 pM 的 K_D 结合 ActRIIA-mFc (二聚体蛋白) (图 9),并以低 10 倍的亲和力结合用组氨酸标记的单体 ActRIIA (ActRIIA-His)。

[0197] 另外,使用基于 BIACORE™的分析来确定 Ab-14E1 是否可以阻断 ActRIIA 与它的同源配体的结合。以 2 种不同的试验构型预温育 ActRIIA-Fc 和 Ab-14E1,会显著地阻止多种配体与 ActRIIA-Fc 的结合 (图 10-11),从而指示 Ab-14E1 的中和能力。当用被组氨酸

标记的 ActRIIA 的单体细胞外结构域替代二聚体 ActRIIA-Fc 时,得到了类似的结果。此外,ActRIIA 配体(最显著地是激活素 A)会以浓度依赖性的方式竞争性地抑制 Ab-14E1 与 ActRIIA-Fc 的结合(图 12),从而提供了由于共有的表位而进行 ActRIIA 中和的额外证据。

[0198] 实施例 5. 在基于细胞的测定中 Ab-14E1 对 ActRIIA 信号传递的中和

使用在 A204 细胞中的报道基因测定来评价纯化的抗-ActRIIA 抗体对通过 ActRIIA 配体激活素 A 和激活素 B 的信号传递的影响。该测定是基于用 pGL3(CAGA)12 报告质粒(Dennler 等人, 1998, EMBO 17: 3091-3100)以及 Renilla 报告质粒(pRLCMV)(用于控制转染效率)转染的人横纹肌肉瘤细胞系。CAGA12 基序存在于 TGF- β 应答基因(PAI-1 基因)中,所以该载体对于通过 Smad2 和 Smad3 进行信号传递的因子具有普遍用途。由于 A204 细胞系主要表达 ActRIIA,它适用于测试抗体的潜在 ActRIIA 中和能力。在没有这样的抑制剂存在下,ActRIIA 配体可以剂量依赖性地刺激 A204 细胞中的 ActRIIA 信号传递。

[0199] 在测定的第 1 天,以 10^5 个细胞/孔,在 48-孔平板中分布 A204 细胞(ATCC HTB-82)。次日,将含有 10 μ g pGL3(CAGA)12、1 μ g pRLCMV、30 μ l Fugene 6 (Roche Diagnostics)和 970 μ l OptiMEM (Invitrogen)的溶液预温育 30 min,然后加入 McCoy 氏生长培养基中,将其施加给铺板的细胞(500 μ l/孔)在室温温育过夜。在第 3 天,取出培养基,并将细胞与在含有 0.1% BSA 的磷酸盐缓冲盐水中稀释的试验物(250 μ l/孔)一起在 37 $^{\circ}$ C 温育 6 h。冲洗以后,用被动裂解缓冲液(Promega E1941)裂解细胞,并在 -70 $^{\circ}$ C 保存过夜。在第 4 天和最后一天,在轻轻摇动下将平板温热至室温。将细胞裂解物一式两份地转移至化学发光板(96-孔),并用得自 Dual-Luciferase Reporter Assay 系统(Promega E1980)的试剂在光度计中分析,以确定标准化的荧光素酶活性。

[0200] 在该测定中,Ab-14E1 是激活素 A 信号传递的有效抑制剂(图 13)。得到了 Ab-14E1 对于激活素 B 的类似结果,从而指示,Ab-14E1 可以在基于细胞的系统中中和 ActRIIA 介导的信号传递。

[0201] 实施例 6. Ab-14E1 对小鼠中的 FSH 水平的抑制作用

最初通过激活素的增加垂体促性腺细胞的分泌 FSH 的能力来鉴定所述激活素。现在认为,激活素介导的信号传递(部分地通过 ActRIIA)会通过多个调节水平的作用而促进 FSH 分泌(Gregory 等人, 2004, Semin Reprod Med 22:253-267)。因此,申请人研究了 Ab-14E1 的抑制小鼠中的循环的 FSH 浓度的能力,作为抗体的中和能力的体内试验。雌性 C57BL/6 小鼠(6 周龄)接受假手术($n = 16$)或两侧卵巢切除术(OVX; $n = 18$),以去抑制 FSH 分泌,并从而增加对外源性抑制因子的敏感性。小鼠经历 6-周恢复期,然后每周 2 次地用 Ab-14E1 (50 mg/kg, s. c.)或媒介物(Tris 缓冲盐水)处理。在 OVX 小鼠处理后 4 周,并在生殖腺完整的(假手术)小鼠处理后 8 周,收集血液样品,并通过放射免疫测定法确定小鼠 FSH 的血清水平。如图 14 所示,Ab-14E1 处理使 OVX 小鼠中的血清 FSH 浓度下降了超过 50% ($p < 0.01$),并使假手术小鼠中的血清 FSH 浓度下降了超过 30%,尽管后一种差异没有达到统计显著性。该研究的结果与 Ab-14E1 在体内中和 ActRIIA 信号传递的能力相一致。

[0202] 实施例 7. Ab-14E1 对抑制素缺陷型小鼠中的癌症恶病质的影响

具有抑制素 α 亚基遗传缺陷的小鼠会发展过表达激活素 A 和 B 的性腺肿瘤(Matzuk 等人, 1992, Nature 360:313-319; Matzuk 等人, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:8817-8821)。所有这样的小鼠会发展这些肿瘤,并最终死于由高水平的肿瘤衍生的激

活素(其通过 ActRIIA 起作用)介导的癌症恶病质样综合征 (Coerver 等人, 1996, Mol Endocrinol 10:534-543)。因此,申请人研究了 Ab-14E1 的抑制这些小鼠中的恶病质的能力。从 6 周龄开始,用 Ab-14E1 (10 mg/kg) 或媒介物(磷酸盐缓冲盐水)每周 2 次地皮下处理抑制素 α 无效等位基因纯合的雄性和雌性小鼠。每天监测小鼠,并在严重发病(脱水、嗜睡、弓背姿态、不整洁的外观、呼吸困难或减轻了超过原始体重的 20%) 的情况下安乐死,并每周 2 次地测定体重作为处理有效性的指数。如图 15 所示,在研究过程中,用 Ab-14E1 处理的雄性小鼠 ($n = 9$) 表现出比媒介物处理的雄性小鼠 ($n = 11$) 更好的重量增加,且在用 Ab-14E1 处理雄性小鼠的情况下,存在提高存活率的趋势(数据未显示)。不同于它们的雄性对应体,媒介物处理的雌性小鼠意外地没有发展严重的恶病质,并且 Ab-14E1 对雌性小鼠的处理仅导致与媒介物相比体重增加的非显著趋势。该研究的结果指示,Ab-14E1 可以减轻由过度的激活素 -ActRIIA 信号传递造成的肿瘤依赖性的体内恶病质。

[0203] 总之,前述发现证实,用 ActRIIA 抗原免疫接种 ActRIIA- 缺陷型小鼠会产生单克隆抗体 (Ab-14E1),所述单克隆抗体能够以高亲和力结合 ActRIIA、在不同复杂性的多个测定系统中中和 ActRIIA 介导的信号传递、和减轻激活素依赖性的体内癌症恶病质。

[0204] 实施例 8. Ab-14E1 对正常小鼠的肌肉的刺激效应

申请人研究了 Ab-14E1 对正常小鼠的体重和瘦体质的影响。从 6 周龄开始,用 Ab-14E1 (10 mg/kg, i. p., $n = 10$) 或媒介物(磷酸盐缓冲盐水, $n = 5$) 每周 2 次地处理雄性 C57BL/6 小鼠,持续 4 周。每周 2 次地测定体重,并在基线时和在处理 4 周后通过全身核磁共振 (NMR) 确定瘦体质。如图 16 所示,在整个研究过程中,用 Ab-14E1 处理的小鼠表现出比对照组显著更大的重量增加。在研究结束之前,用 Ab-14E1 处理的小鼠增加的全身瘦体质多于对照组的 2 倍(图 17)。在研究结束时,用 Ab-14E1 处理的小鼠的胸肌重量(两侧)比媒介物处理的小鼠大 15%,该差异倾向于显著性 ($p = 0.137$)。另外,与媒介物相比,Ab-14E1 处理存在显著更低的全身脂肪量积累 ($p = 0.058$),这指示,针对 ActRIIA 的抗体可以用于减少脂肪积累。前述结果证实,用抗 -ActRIIA 抗体处理会增加正常小鼠中的重量增长,特别是瘦体质(肌肉量的指标)的增长。

[0205] 通过引用并入

在本文中提及的所有出版物和专利都特此通过引用整体并入,如同明确地且单独地指出每篇单独的出版物或专利通过引用并入。

[0206] 尽管已经讨论了本主题的具体实施方案,但以上的说明是示例性的,并非限制性的。本领域的技术人员在阅读本说明书和以下权利要求书之后会明白许多变化。本发明的完整的范围应当通过参考权利要求及其等同方案的全部范围、以及说明书连同此类变化来确定。

1 DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGYSIT SGYYWNWIRQ FPGNKLEWMG
 51YISYDGSNNY NPSLINRISI TRDTSKNQFF LKLNSVTTED TATYFCASYA
 101YRNDVRFAYW GQGLVTVSA (SEQ ID NO: 12)

图 1

1 DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NFLNWFQKP DGTVKLLIYF
 51 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTITNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG
 101GTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

图 2

E V K L (原始)
 D V Q L (最终)

1 gatgtacagcttcaggagtcaggacctggcctcgtgaaaccttctcagtc
 51 tctgtctctcacctgctctgtcactggctactccatcaccagtggttatt
 101 actggaactggatccggcagtttccaggaaacaaactggaatggatgggc
 151 tacataagctacgacggcagcaataactacaacccatctctcataaatcg
 201 aatctccatcactcgtgacacatctaagaaccagtttttctgaagttga
 251 attctgtgactactgaagacacagctacatatttctgtgcaagttatgcc
 301 tataggaacgacgtgaggtttgcttactggggccaagggactctgggtcac
 351 cgtctccgca (SEQ ID NO: 14)

图 3

1 gatatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggaga
 51 cagagtcacccatcagttgcagggcaagtcaggacattagcaatTTTTTaa
 101 actggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctacttc
 151 acatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtgggcagtgggtc
 201 tggaacagattattctctcaccattaccaacctggagcaagaagatattg
 251 ccacttactTTTgccaacagggtaatacgcttccgtggacgttcgggtgga
 301 ggcaccaagctcgagatcaaa (SEQ ID NO: 15)

图 4

1 DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGGISIT SGYFNWIRQ FPGNKLEWMG
 1 CDR-H1

51 YISDGSNNY NPSLINRISI TRDTSKNQFF LKLNSVTTED TATYFCASYA
 CDR-H2 2

101 RRRQVRFALW GQGLVTVSA
 CDR-H3

图 5

1 AILGRSETQE CLFFNANWEK DRTNQTGVEP CYGDKDKRRH CFATWKNISG
 51 SIEIVKQGCW LDDINCYDRT DCVEKKDSPE VYFCCCEGNM CNEKFSYFPE
 101 MEVTQPTSNP VTPKPP (SEQ ID NO: 16)

图 6

```

                                * * * * *
1  DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NFLNWYQQKP DGTVKLLIYF
                                1   CDR-L1
                                * * * * *

    * * * * *          *          * * * * *
51  TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTITNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG
    CDR-L2                                2   CDR-L3

101  GTKLEIK

```

图 7

```

                                *   *           *   * * *
1  AILGRSETQE CLFFNANWEK DRTNQTGVPEP CYGDKDKRRH CFATWKNISG
                                * * * * *

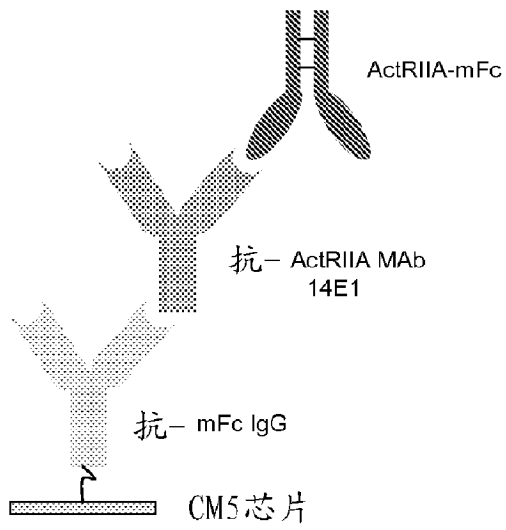
    * *   *   * * * * *           *   * * * *
51  SIEIVKQGCW LDDINCYDRT DCVEKKDSPE VYFCCCEGNM CNEKFSYFPE

101  MEVTQPTSNP VTPKPP

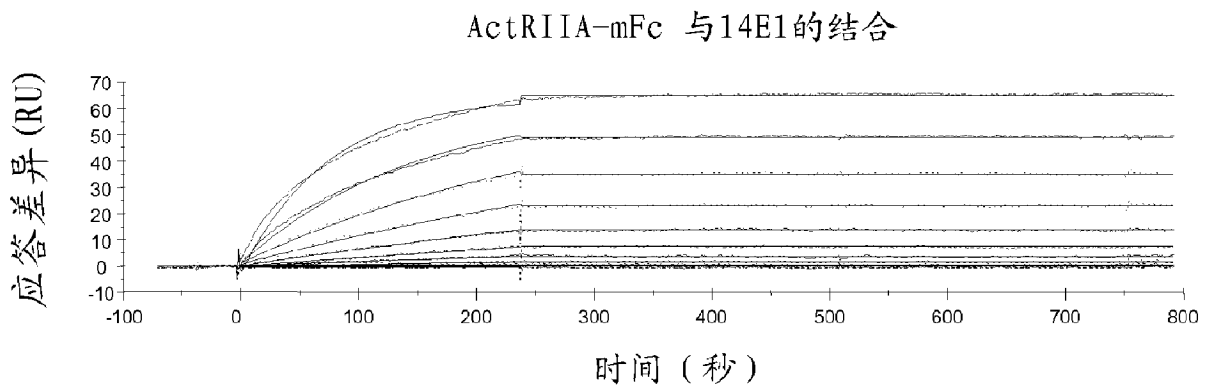
```

图 8

A



B



$$K_D \approx 1.2 \times 10^{-11} \text{ (M)}$$

$$k_a = 8.6 \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$$

$$k_d \approx 1 \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

图 9

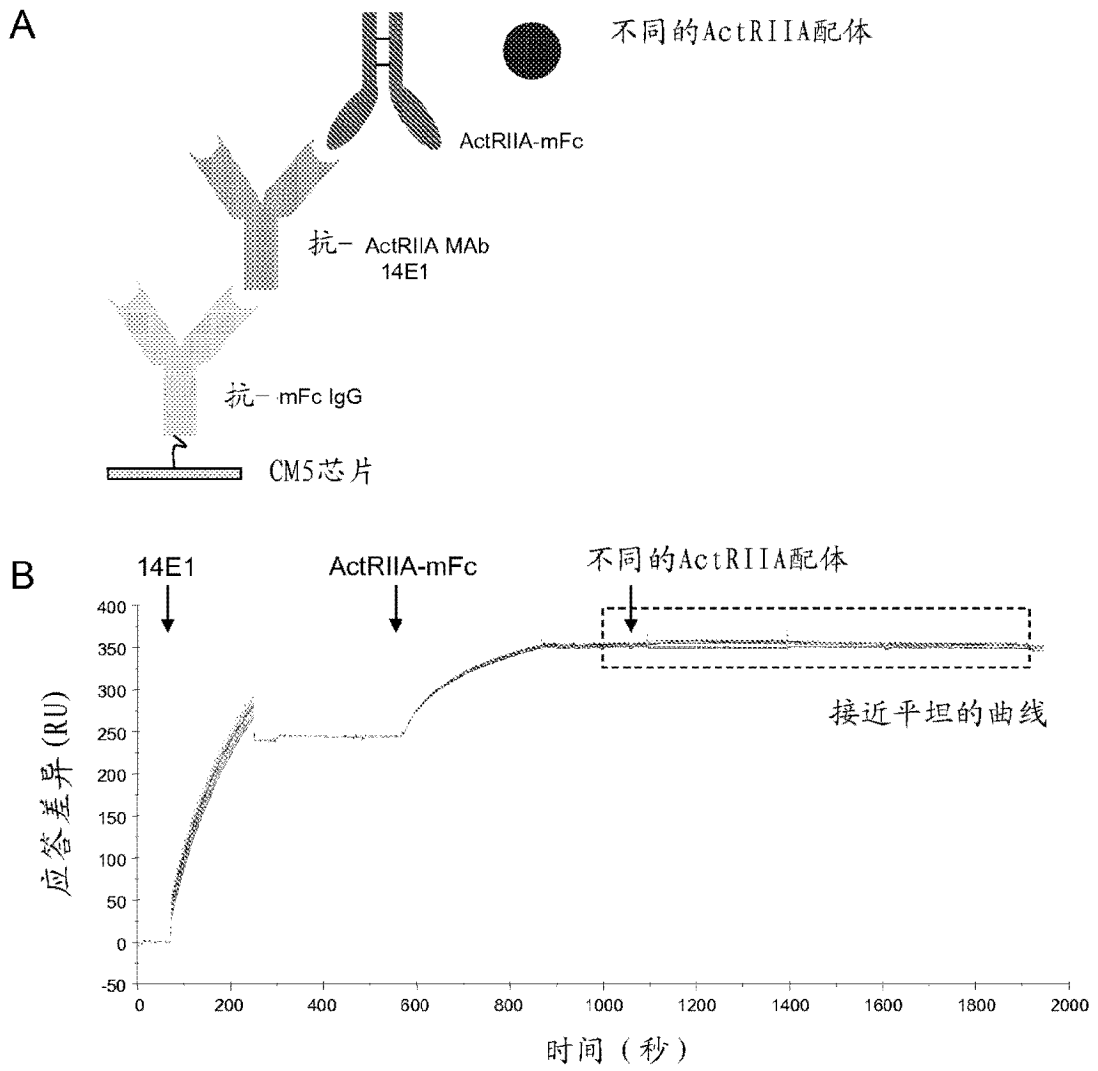


图 10

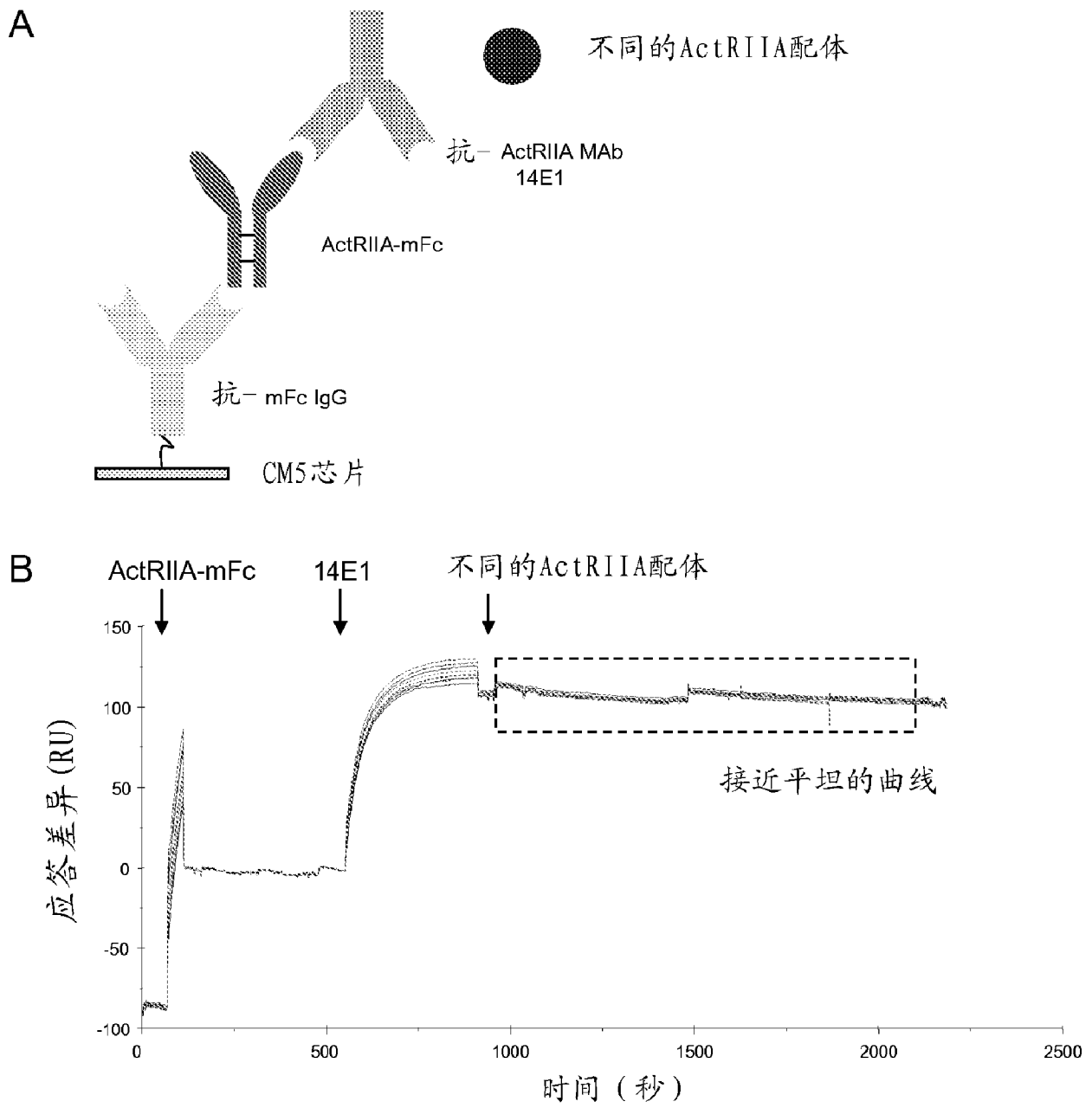


图 11

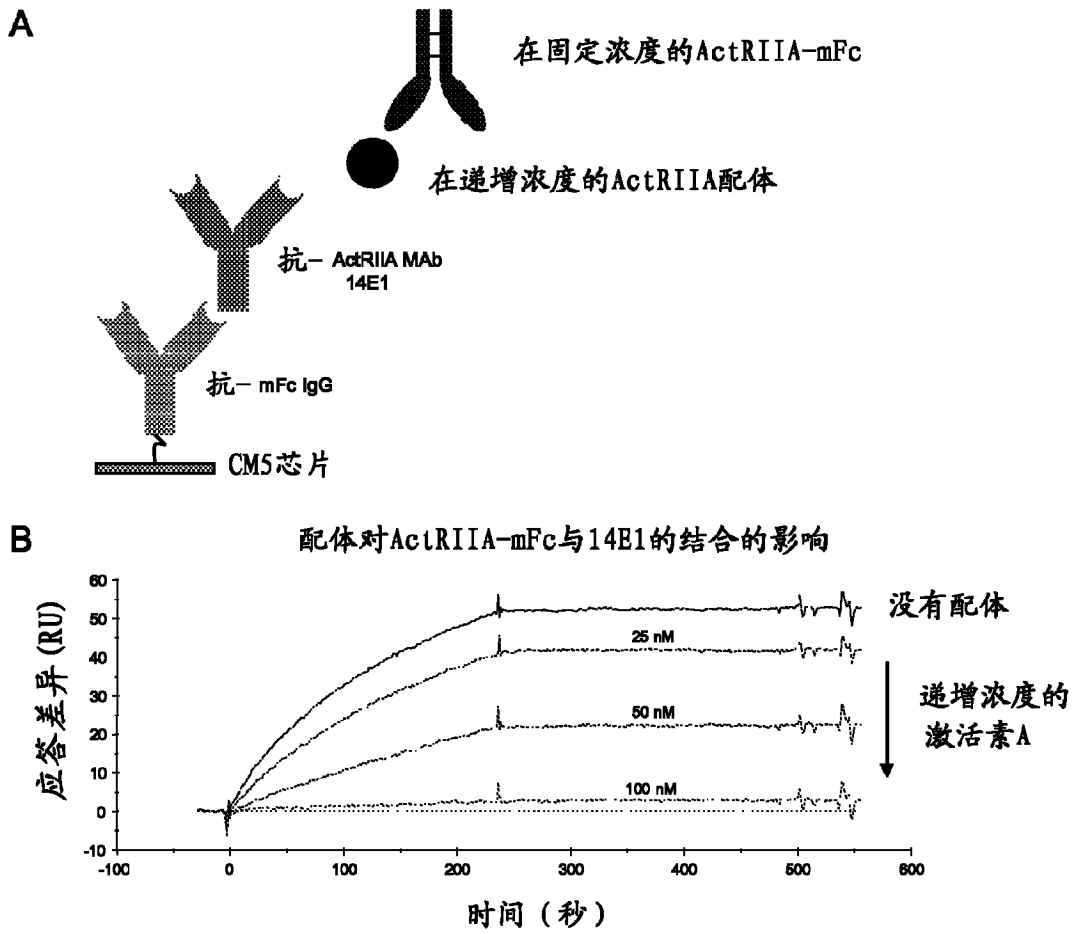


图 12

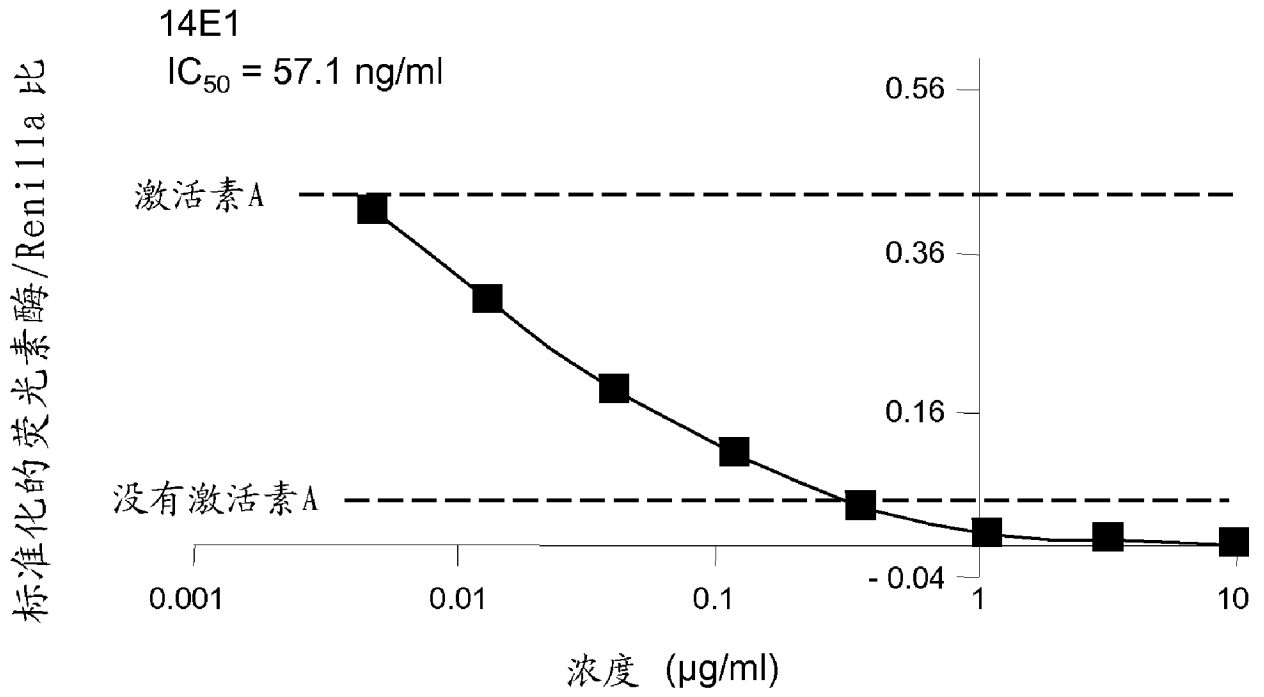


图 13

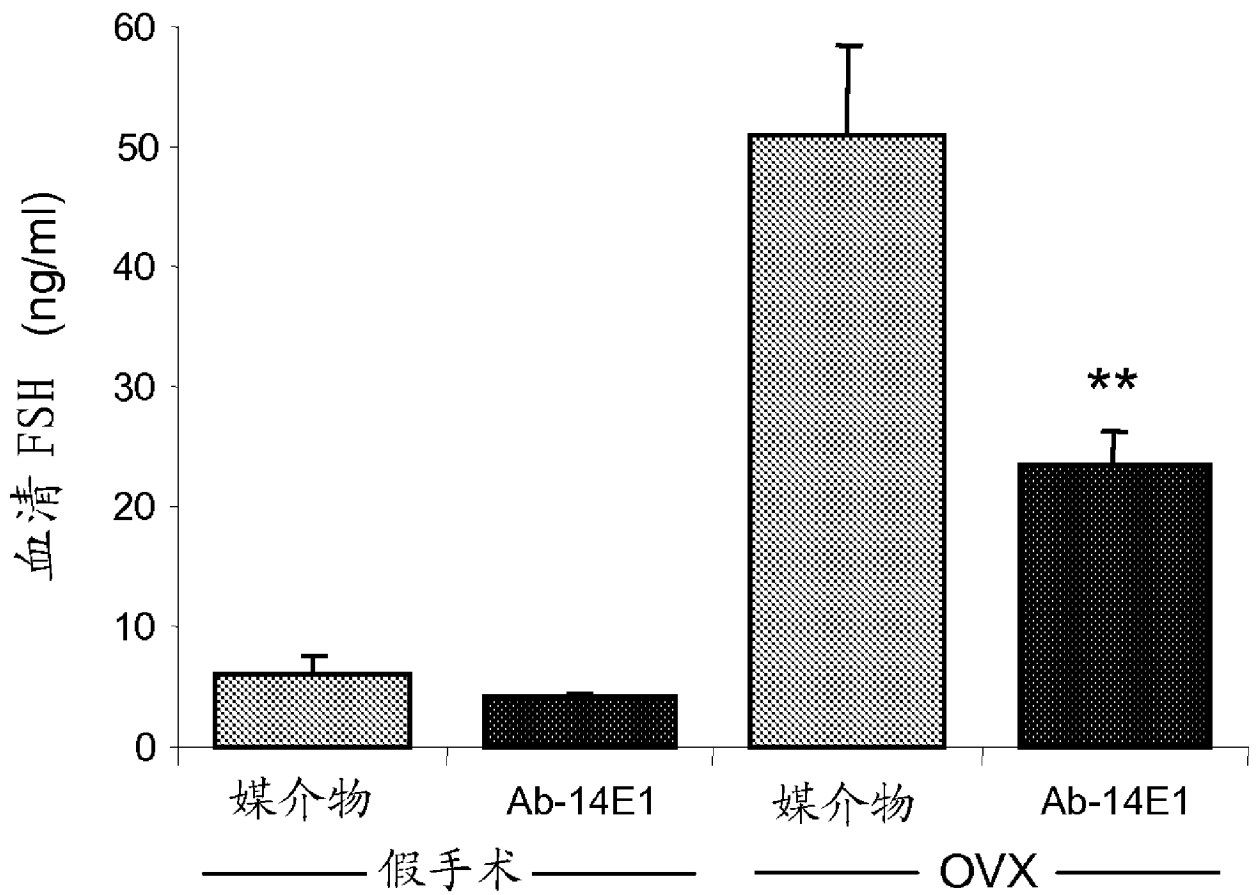


图 14

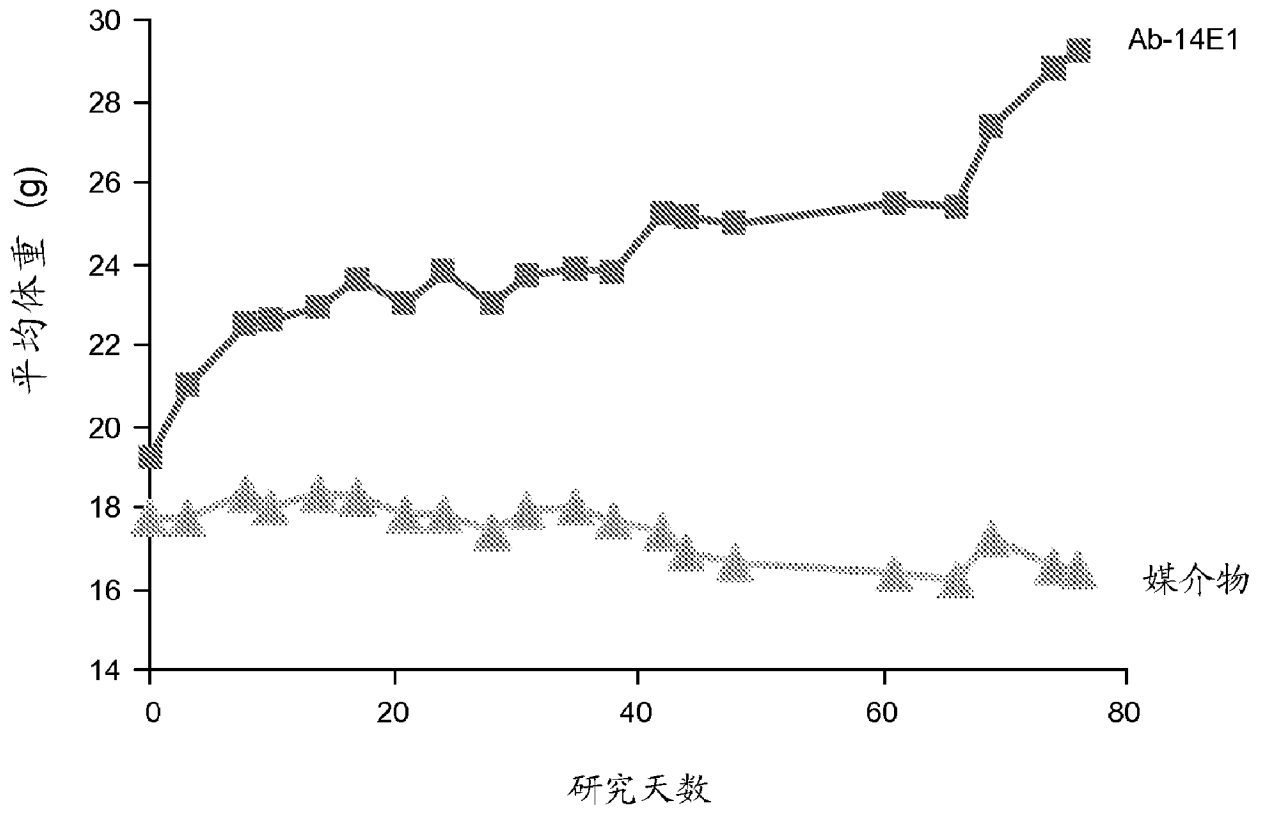


图 15

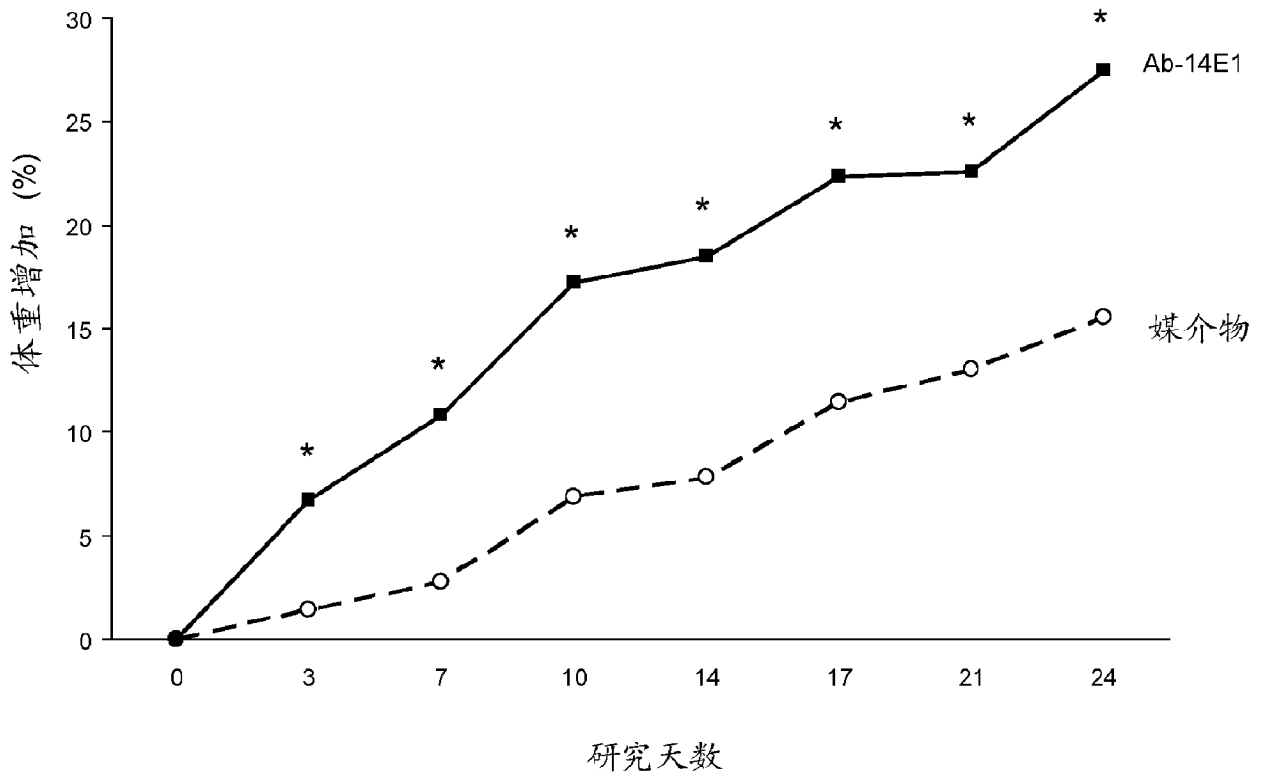


图 16

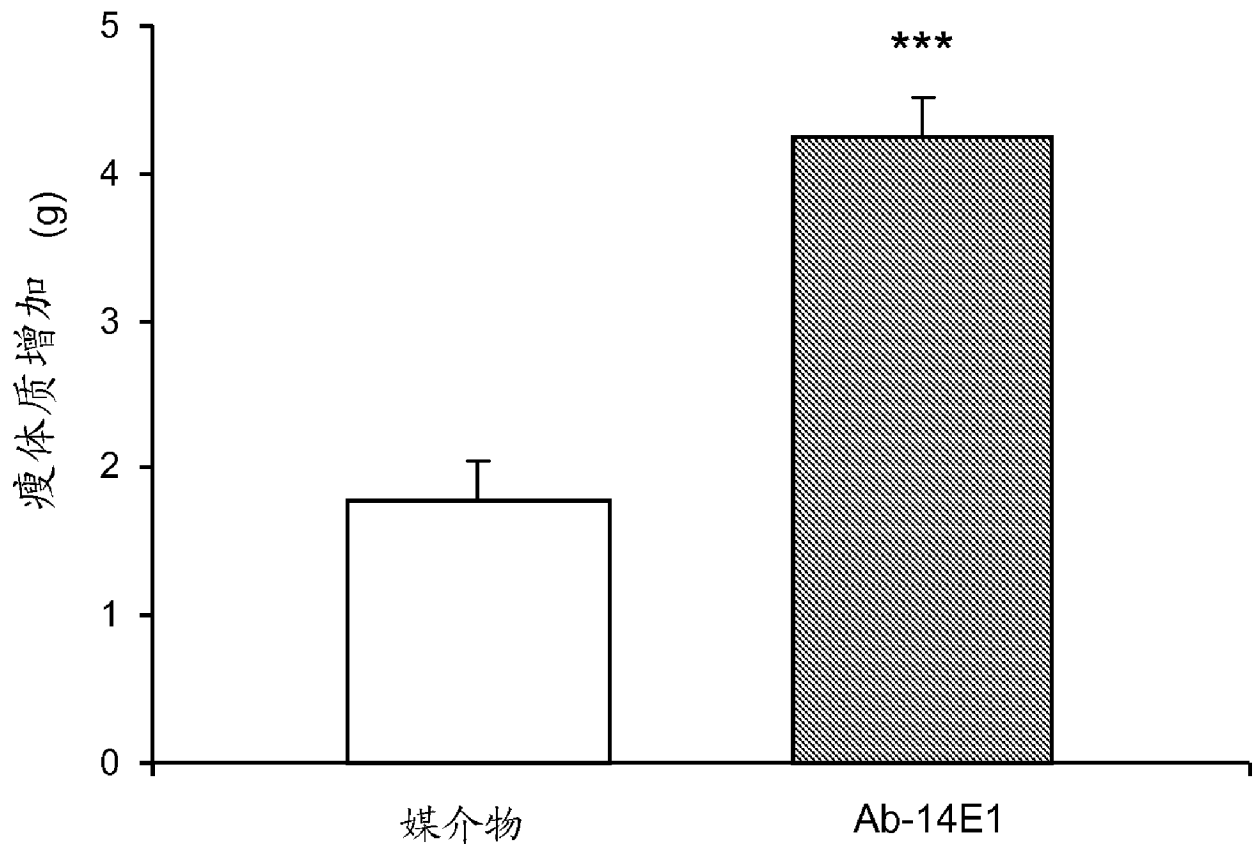


图 17