



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101835485 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

(21) 申请号 200880011264.X

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2008.02.01

(30) 优先权数据

60/899,070 2007.02.01 US

61/000,540 2007.10.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.10.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/001429 2008.02.01

(87) PCT申请的公布数据

W02008/094708 EN 2008.08.07

(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 J·克诺普夫 J·西赫拉 R·库马

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 张萍 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 38/18(2006.01)

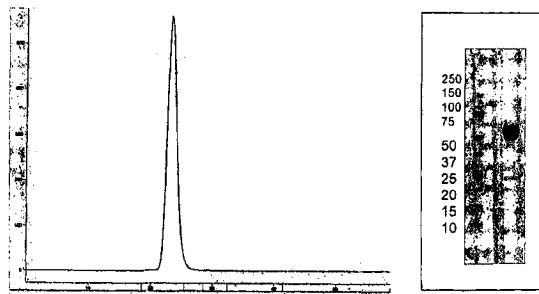
权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 2 页

(54) 发明名称

活化素-ACTRIIA 拮抗剂及在治疗或预防乳腺癌中的用途

(57) 摘要

在某些方面,本发明提供了用于治疗或预防人乳腺癌的组合物和方法。



1. 在病人中治疗或预防乳腺癌或乳腺癌相关的骨质流失的方法,所述方法包括对患者给予有效量的 ActRIIa-Fc 融合蛋白。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白选自:
 - a) 包含与 SEQ ID NO :2 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;
 - b) 包含与 SEQ ID NO :3 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;和
 - c) 包含 SEQ ID NO :2 的至少 50 个连续氨基酸的多肽。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有一种或多种如下特性:
 - i. 以至少 10^{-7} M 的 K_D 与 ActRIIa 配体结合;和
 - ii. 在细胞中抑制 ActRIIa 信号传导。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含一种或多种修饰的氨基酸残基,其选自:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸以及与有机衍生剂缀合的氨基酸。
5. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ IDNO :3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。
6. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ IDNO :3 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。
7. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ IDNO :3 的氨基酸序列。
8. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白为由两个多肽形成的二聚体,所述多肽各自包含与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,并且其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 3 个或多个唾液酸部分。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含 3 到 5 个唾液酸部分。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述方法导致所述患者骨骼肌质量低于 10% 的增加。
13. 如权利要求 11 所述的方法,其中给予所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白,以便在患者中达到至少 0.2mg/kg 的血清浓度。
14. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白具有 SEQ IDNO :7 的氨基酸序列。
15. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白在正常、健康的人中的血清半衰期介于 15 到 40 天之间。
16. 如权利要求 11 所述的方法,其中对所述患者给予所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白的频率不超过每周一次。
17. 如权利要求 11 所述的方法,其中对所述患者给予所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白的频率

不超过每月一次。

18. 如权利要求 11 所述的方法,其中对所述患者给予所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白的频率不超过每 3 个月一次。

19. 如权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法,其中所述患者正在接受受骨抗吸收疗法、或者在给予所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白之前 1 年之内已经接受骨抗吸收疗法。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述抗吸收剂选自:二膦酸盐药剂、RANK 配体拮抗剂以及骨保护素拮抗剂。

21. 如权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法,其进一步包括对所述病人给予放射疗法、内分泌疗法或细胞毒药剂。

22. 如权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法,其中所述病人为具有一种或多种乳腺癌风险因素的女性。

23. 治疗或预防乳腺癌或乳腺癌相关的骨质流失的方法,所述方法包括向有此需要的对象给予有效量的活化素 -ActRIIa 拮抗剂。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂为活化素或 ActRIIa 拮抗剂多肽。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂为选自下列的抗体:

- a. 抗活化素抗体;和
- b. 抗 ActRIIa 抗体。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中给予所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂导致延迟乳腺癌的发作、抑制乳腺癌进展、延迟发生转移或减小肿瘤尺寸。

27. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述对象为人。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述人为具有一种或多种乳腺癌风险因素的女性。

29. 如权利要求 23 所述的方法,其进一步包括对所述对象给予放射疗法、内分泌疗法或细胞毒药剂。

30. 鉴定对治疗或预防乳腺癌有用的药剂的方法,所述方法包括:

- a. 鉴定与 ActRIIa 配体竞争性结合于 ActRIIa 多肽的配体结合结构域的测试药剂;和
- b. 评估所述药剂对乳腺癌细胞增殖或存活的影响。

31. 在患有乳腺癌的病人中抑制活化素介导的信号传导的方法,所述方法包括对病人给予有效量的活化素 -ActRIIa 拮抗剂。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂为活化素或 ActRIIa 拮抗剂多肽。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂为活化素或 ActRIIa 拮抗剂多肽。

34. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂是选自下列的抗体:

- a. 抗活化素抗体;和
- b. 抗 ActRIIa 抗体。

35. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂多肽选自:

- a. 包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;

- b. 包含与 SEQ ID NO :3 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽 ;
- c. 包含选自 SEQ ID NO :2 的至少 50 个连续氨基酸的多肽。

36. 如权利要求 31 所述的方法, 其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂多肽具有一种或多种如下特性 :

- i. 以至少 10^{-7} M 的 K_D 与 ActRIIa 配体结合 ; 和
- ii. 在细胞中抑制 ActRIIa 信号传导。

37. 如权利要求 35 所述的方法, 其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂多肽为融合蛋白, 除 ActRIIa 多肽结构域之外, 其包含增强下列各项中的一种或多种的一个或多个多肽部分 : 体内稳定性、体内半衰期、摄取 / 给药、组织定位或分布、蛋白复合物的形成和 / 或纯化。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中所述融合蛋白包含选自下列的多肽部分 : 免疫球蛋白 Fc 结构域和血清白蛋白。

39. 如权利要求 37 所述的方法, 其中所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂多肽包含一种或多种修饰的氨基酸残基, 其选自 : 糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸以及与有机衍生剂缀合的氨基酸。

40. ActRIIa-Fc 融合蛋白在制备用于在病人中治疗或预防乳腺癌或乳腺癌相关的骨质流失的药物中的用途。

41. 用于在病人中治疗或预防乳腺癌或乳腺癌相关的骨质流失的 ActRIIa-Fc 融合蛋白。

42. 活化素 -ActRIIa 拮抗剂在制备用于在对象中治疗或预防乳腺癌或乳腺癌相关的骨质流失的药物中的用途。

43. 用于在对象中治疗或预防乳腺癌或乳腺癌相关的骨质流失的活化素 -ActRIIa 拮抗剂。

44. 活化素 -ActRIIa 拮抗剂在制备在患有乳腺癌的病人中抑制病人活化素介导的信号传导的药物中的用途。

45. 用于在患有乳腺癌的病人中抑制活化素介导的信号传导的活化素 -ActRIIa 拮抗剂。

活化素 -ACTRIIA 拮抗剂及在治疗或预防乳腺癌中的用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2007 年 2 月 1 日提交的序列号为 60/899,070 的美国临时专利申请和于 2007 年 10 月 25 日提交的序列号为 61/000,540 的美国临时专利申请的权益。上述申请的全部教导在此引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 乳腺癌是西方国家女性中最常见的癌症类型,每年影响超过 180,000 美国女性。该病发生在由分枝导管系统组成的乳腺。每一个乳腺或乳房包含 15 到 20 个称为乳腺小叶 (lobe) 的部分,每个乳腺小叶包含一系列汇集到乳头的分枝的导管。沿 (line) 每条导管排列的上皮细胞负责生产乳汁。侵袭性乳腺癌被认为是由末梢导管 / 小叶单位的正常上皮细胞通过一系列不断增加的异常增殖性病变产生。一旦肿瘤获得转移的能力,乳腺癌细胞会扩散到其它器官,使治疗更加困难。最常见的乳腺癌转移部位是肺、肝、和骨骼。向骨骼的转移通常会伴随剧痛、骨质流失、以及骨折风险增高。在乳腺癌治疗中应用的很多抗雌激素疗法也会伴随骨质流失加速。

[0005] 诊断为乳腺癌的患者通常进行手术和 / 或放射疗法来治疗原发瘤,然后用辅助疗法治疗可能扩散到远处的癌细胞。辅助疗法由细胞毒化疗和 / 或内分泌疗法组成。虽然化疗对治疗多种恶性肿瘤有效,但是很多抗肿瘤化合物会诱导不良的副作用。另外,很多肿瘤对化疗和内分泌疗法没有反应或产生抗性。虽然辅助疗法改善了乳腺癌患者的死亡率,但是最常见的组织病理学类型的侵袭性乳腺癌患者的 10 年生存率仍然只有 35% 到 50% (Weigelt 等人 2005 Nat. Rev. Cancer 5 :591-602)。此外,由于缺乏预后标准,通过单独局部疗法治愈的很多女性不必要地接受了辅助疗法。

[0006] 因此,需要更高效率的且更有效的抗乳腺癌分子靶标。比化疗和内分泌疗法更低毒性和 / 或更有效的替代疗法可改善治疗方法并提高生存率。此外,有些患者可能存在发展成扩散性或转移性乳腺癌的风险,可对这些患者进行预防性治疗的药剂在临床上是有用的。因此,本发明的一个目标是提供替代性组合物和方法,用于治疗乳腺癌或者抑制或预防乳腺癌的进展。

[0007] 发明概述

[0008] 部分而言,本公开内容涉及使用活化素拮抗剂以及 ActRIIa 拮抗剂治疗或预防乳腺癌或乳腺癌伴随的骨质流失 (bone loss)。具体来说,本公开内容提供了治疗或预防乳腺癌的方法,该方法使用充当活化素抑制剂的可溶形式的 ActRIIa。尽管可溶性 ActRIIa 可能通过活化素拮抗以外的机制影响癌细胞生长或存活,但是合意的治疗剂可在活化素拮抗或 ActRIIa 拮抗或者两者的基础上进行选择。此类药剂被统称为活化素 -ActRIIa 拮抗剂。因此,在某些实施方案中,本公开内容提供使用活化素 -ActRIIa 拮抗剂在有此需要的患者中治疗或预防乳腺癌的方法,所述活化素 -ActRIIa 拮抗剂包括,例如,活化素 - 结合 ActRIIa 多肽 (activin-binding ActRIIa polypeptide)、抗活化素抗体、抗 ActRIIa 抗体、靶向活化素或 ActRIIa 的小分子和适体、以及减少活化素和 ActRIIa 表达的核酸。如序列号为 11/603,485 的美国专利申请 (在此引入作为参考) 所述,活化素 -ActRIIa 拮抗剂可

用于促进骨生长和提高骨密度。如本文所述,此类拮抗剂还可用于治疗或预防乳腺癌、乳腺癌向骨骼的转移、以及乳腺癌伴随的骨质流失。

[0009] 在某些方面,本公开内容提供使用多肽治疗或预防乳腺癌的方法,所述多肽包括与活化素结合的可溶性、活化素-结合 ActRIIa 多肽。可将 ActRIIa 多肽配制成包含该活化素-结合 ActRIIa 多肽和药学上可接受的载体的药物制剂。该活化素-结合 ActRIIa 多肽可以小于 1 微摩尔或小于 100、10 或 1 纳摩尔的 K_D 与活化素结合。任选地,相对于 GDF11 和 / 或 GDF8,该活化素-结合 ActRIIa 多肽选择性地结合活化素,并任选地以比结合 GDF11 和 / 或 GDF8 至少低 10 倍、20 倍或 50 倍的 K_D 结合活化素。尽管不希望受到特定作用机制的束缚,预期这种活化素抑制胜过 GDF11/GDF8 抑制的选择性程度说明了对骨骼或肿瘤存活或生长的影响,而对肌肉没有一致可测的影响。在许多实施方案中,将选择 ActRIIa 多肽,从而在达到对癌细胞的所需影响的剂量下,引起肌肉中小于 15%、小于 10% 或小于 5% 的增长。如通过尺寸排阻色谱所估计,该组合物相对于其它多肽成分可具有至少 95% 的纯度,任选地,该组合物具有至少 98% 的纯度。用于此类制剂的活化素-结合 ActRIIa 多肽可以是本文所述的那些多肽的任意种,例如具有选自 SEQ ID NOs :2、3、7 或 12 的氨基酸序列的多肽,或具有与选自 SEQ ID NOs :2、3、7、12 或 13 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 同一性的氨基酸序列的多肽。活化素-结合 ActRIIa 多肽可包含天然 ActRIIa 多肽的功能性片段,例如包含选自序列 SEQ ID NOs :1-3 或序列 SEQ ID NO :2 的至少 10、20、30、50 或 90 个或更多氨基酸,缺失 C-末端 10 至 15 个氨基酸(“尾部”)的功能性片段。

[0010] 可溶性、活化素-结合 ActRIIa 多肽可包括相对天然存在的 ActRIIa 多肽在氨基酸序列(例如,在配体结合结构域)中的一个或多个变化。在 WO 2006/012627 的第 59-60 页(在此引入作为参考)中提供了变化的 ActRIIa 多肽的实例。氨基酸序列中的变化可以例如,当其在哺乳动物、昆虫或其它真核细胞中生成时改变多肽的糖基化,或者相对于天然存在的 ActRIIa 多肽改变多肽的蛋白酶裂解。

[0011] 活化素-结合 ActRIIa 多肽可以是一种融合蛋白,其具有作为一种结构域的 ActRIIa 多肽(例如,ActRIIa 的配体结合部分)和提供所需特性(例如改善的药代动力学、更简单的纯化、增强的对特定组织的靶向等)的一种或多种其它结构域。例如,融合蛋白的结构域可增强以下各项中的一种或多种:体内稳定性、体内半衰期、摄取/给药、组织定位或分布、蛋白复合物的形成、该融合蛋白的多聚和/或纯化。活化素-结合 ActRIIa 融合蛋白可包含提供所需特性(例如改善的药代动力学、提高的溶解度或提高的稳定性)的免疫球蛋白 Fc 结构域(野生型或突变体)或血清白蛋白或其它多肽部分。在优选的实施方式中,ActRIIa-Fc 融合包含位于 Fc 结构域和胞外 ActRIIa 结构域之间的相对非结构化(unstructured)的接头。该非结构化的接头可对应于在 ActRIIa 的胞外结构域的 C-末端的约 15 个氨基酸的非结构化区(“尾部”),或者它可以是相对不含二级结构的 1、2、3、4 或 5 个氨基酸的人工序列或长度在 5 与 15、20、30、50 或更多氨基酸之间的人工序列,或者两者的混合物。接头可富含甘氨酸或脯氨酸残基,并可以例如,含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单独序列或苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列(例如, TG₄ 或 SG₄ 单态或重复)。融合蛋白可包含纯化子序列(subsequence),例如表位标记、FLAG 标记、聚组氨酸序列和 GST 融合。任选地,可溶性 ActRIIa 多肽包含选自如下的一种或多种修饰的氨基酸残基:糖基化氨

基酸、聚乙二醇化 (PEGylated) 氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合 (conjugated) 的氨基酸以及与有机衍生剂缀合的氨基酸。药物制剂还可包含一种或多种额外化合物,例如可用于治疗骨病的化合物。优选地,药物制剂基本不含热原。一般而言,优选在哺乳动物细胞系中表达 ActRIIa 蛋白,其合适地介导 ActRIIa 蛋白的天然糖基化,从而减少患者中的不利免疫应答的可能性。人和 CHO 细胞系已被成功使用,预期其它常见的哺乳动物表达系统将是有益的。另外,酵母和其它细胞类型已被遗传改造以表达催化糖基化的哺乳动物酶,从而允许在这些非哺乳动物细胞中表达的蛋白上产生严格控制的类似哺乳动物的糖基化。这些重组细胞系还可用于表达本文所述的蛋白。

[0012] 如本文所述的 ActRIIa 蛋白特指具有所需特性的 ActRIIa-Fc (在 ActRIIa 部分和 Fc 部分之间具有最小接头的形式),所述特性包括在动物模型中相对 GDF8 和 / 或 GDF11 的选择性结合活化素、高亲和性配体结合和大于两周的血清半衰期。在某些实施方式中,本发明提供使用 ActRIIa-Fc 多肽和包含此类多肽和药学上可接受的赋形剂的药物制剂来治疗或预防乳腺癌的方法。

[0013] 在某些方面,本公开内容提供使用编码可溶性活化素 - 结合 ActRIIa 多肽的核酸治疗或预防乳腺癌的方法。分离的多核苷酸可包含例如上述可溶性、活化素 - 结合 ActRIIa 多肽的编码序列。例如,分离的核酸可包含编码 ActRIIa 的胞外结构域 (例如,配体结合结构域) 的序列以及编码 ActRIIa 的部分或全部跨膜结构域和 / 或细胞质结构域,除定位在该跨膜结构域或细胞质结构域中、或定位在该胞外结构域与该跨膜结构域或细胞质结构域之间的终止密码子外的序列。例如,分离的多核苷酸可包含全长 ActRIIa 多核苷酸序列 (例如,SEQ ID NO :4 或 5),或部分截短的形式 (truncated version),所述分离的多核苷酸进一步包含在 3' - 末端之前至少六百个核苷酸处或其它位置的转录终止密码子,从而使该多核苷酸的翻译形成任选地融合至全长 ActRIIa 的截短部分的胞外结构域。优选的核酸序列为 SEQ ID NO :14。对本文所述方法有用的核酸可操作地连接至表达用启动子,且本公开内容提供用此类重组多核苷酸转化的细胞。所述细胞优选为哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0014] 本公开内容还提供制备可用于治疗或预防乳腺癌的可溶性、活化素 - 结合 ActRIIa 多肽的方法。所述方法可包括在合适的细胞 (例如 CHO 细胞) 中表达本文公开的任意核酸 (例如,SEQ ID NO :4、5 或 14)。此类方法可包括 :a) 在适于表达所述可溶性 ActRIIa 多肽的条件下培养细胞,其中用可溶性 ActRIIa 表达构建体转化所述细胞 ;和 b) 回收如此表达的可溶性 ActRIIa 多肽。可溶性 ActRIIa 多肽可作为粗制的、部分纯化的或高度纯化的级分回收。可通过一系列纯化步骤实现纯化,所述纯化步骤包括例如,任意顺序的如下步骤中的一种、两种或三种或多种 :A 蛋白色谱、阴离子交换色谱 (例如 Q 琼脂糖)、疏水作用色谱 (例如苯基琼脂糖)、尺寸排阻色谱以及阳离子交换色谱。

[0015] 在某些方面,本文公开的活化素 -ActRIIa 拮抗剂 (例如可溶性、活化素 - 结合 ActRIIa 多肽) 可用于在对象中治疗、预防或抑制乳腺癌的方法,包括例如,延迟乳腺癌发作、抑制乳腺癌进展、减小肿瘤尺寸、防止肿瘤生长、延迟转移发生或防止转移 (包括向骨骼转移) 的方法。在某些实施方案中,本公开内容提供在有此需要的患者中减少或抑制乳腺癌细胞的生长或存活的方法。一种方法可包括对有此需要的对象给予有效量的活化素 -ActRIIa 拮抗剂。在某些方面,本公开内容提供活化素 -ActRIIa 拮抗剂在制备用于

治疗或预防本文所述乳腺癌的药物中的用途。本公开内容还涉及联合疗法,其包含活化素-ActRIIa 拮抗剂与放射疗法、化疗(例如,细胞毒药剂)和/或内分泌疗法。所述拮抗剂可以是 ActRIIa-Fc 融合蛋白,其中所述 ActRIIa-Fc 融合蛋白包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0016] 在进一步的实施方案中,本发明涉及在具有一种或多种乳腺癌风险因素的患者中预防或延迟乳腺癌发作的方法。在一些实施方案中,本发明涉及在已诊断患有原发乳腺肿瘤或乳腺增殖性病变的患者中预防或延迟转移性疾病发作的方法。在病人中预防或延迟乳腺癌发作的方法可包括对有此需要的病人给予有效量的多肽,所述多肽选自:a) 包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;b) 包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;c) 包含选自 SEQ ID NO:2 的至少 50 个连续氨基酸的多肽。

[0017] 本发明的其它实施方案涉及在患有乳腺癌的病人中抑制活化素介导的信号传导的方法。在某些实施方案中,所述方法包括对所述病人给予有效量的活化素-ActRIIa 拮抗剂。在进一步的实施方案中,所述拮抗剂是选自以下的多肽:a) 包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;b) 包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽;c) 包含选自 SEQ ID NO:2 的至少 50 个连续氨基酸的多肽。

[0018] 在某些方面,本公开内容提供用于鉴定抑制癌细胞(例如,乳腺癌细胞)生长或存活的药剂的方法。所述方法包括:a) 鉴定与活化素或 ActRIIa 多肽的配体结合结构域结合的测试药剂;b) 评估所述药剂对癌细胞增殖、存活或凋亡的影响。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示了在 CHO 细胞中表达的 ActRIIa-hFc 的纯化。所述蛋白纯化为单一的、充分确定(well-defined)的峰,其通过分级柱(sizing column)(左图)和考马斯染色的 SDS-PAGE(右图)显现(左泳道:分子量标准物;右泳道:ActRIIa-hFc)。

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

[0022] 图 3 显示了在转移性乳腺癌的小鼠模型中 ActRIIa-mFc 治疗显著减少了转移性病变的形成。在心内注射表达荧光素酶的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 5 周后,对小鼠进行非侵入性观察(麻醉,荧光成像)。只载体处理的小鼠中 12 只显示可见的转移性病变,但是 12 只 ActRIIa-mFc 处理的小鼠中只有 4 只显示可见的病变。

[0023] 发明详述

[0024] 1. 综述

[0025] 转化生长因子- β (TGF- β) 超家族包含各种具有共同的序列元件和结构基序的生长因子。这些蛋白已知对脊椎动物和无脊椎动物两者中的各种各样的细胞类型产生生物学效应。该超家族的成员在胚胎发育过程中在图式形成和组织特化中起重要作用,并能影响各种分化过程,包括脂肪生成、肌细胞生成、软骨发生、心脏发生、血细胞生成、神经发生以及上皮细胞分化。该家族被分为两大分支: BMP/GDF 和 TGF- β / 活化素分支,其成员具有不同的,通常是互补的作用。通过操控 TGF- β 家族成员的活性,通常可能引起有机体的明显生理变化。例如,皮埃蒙特牛与比利时蓝牛品种携带 GDF8(也称为肌肉生长抑制因子)基因的功能丧失突变,其导致肌肉质量的明显增加。Grobet 等人, Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4。此外,在人中,灭活 GDF8 等位基因与肌肉质量的上升相关,且据报道与异常的力量相

关。Schuelke 等人, N Engl J Med 2004, 350 :2682-8。

[0026] 活化素是二聚多肽生长因子, 其属于 TGF- β 超家族。存在三种主要的活化素形式 (A、B 和 AB), 其为两种密切相关的 β 亚基的同源 / 异源二聚体 (分别为 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$)。人基因组还编码活化素 C 和活化素 E, 其主要在肝中表达, 还已知含有 β_C 或 β_E 的异源二聚体形式。在 TGF- β 超家族中, 活化素是独特且多功能的因子, 它能刺激卵巢和胎盘细胞中的激素生成, 支持神经元细胞存活, 根据细胞类型积极或消极影响细胞周期进展, 并至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层的分化 (DePaolo 等人, 1991, Proc SocExp Biol Med. 198 :500-512 ;Dyson 等人, 1997, Curr Biol. 7 :81-84 ;Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55 :953-963)。此外, 业已显示活化素 B 涉及小鼠乳腺上皮细胞分化的调控 (Robinson 和 Hennighausen, 1997 Development 124 :2701-2708)。在数种组织中, 活化素信号传导被它的相关异源二聚体抑制素所拮抗。例如, 在从脑垂体释放促滤泡激素 (FSH) 的过程中, 活化素促进 FSH 分泌和合成, 而抑制素阻止 FSH 的分泌和合成。可调节活化素生物活性和 / 或与活化素结合的其它蛋白包括促滤泡抑制素 (FS)、促滤泡抑制素相关蛋白 (FSRP) 和 α_2 -巨球蛋白。

[0027] TGF- β 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, 其在受到配体刺激时磷酸化和激活下游 Smad 蛋白 (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 :169-178)。这些 I 型和 II 型受体为跨膜蛋白, 由具有富含半胱氨酸区的配体-结合胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸 / 苏氨酸特异性的细胞质结构域所组成。I 型受体为信号传导所必需 ;II 型受体为结合配体以及表达 I 型受体所需要。I 和 II 型活化素受体在配体结合后形成稳定的复合物, 导致 I 型受体被 II 型受体磷酸化。

[0028] 两种有关的 II 型受体 (ActRIIa 和 ActRIIb) 已被鉴定为活化素的 II 型受体 (Mathews 和 Vale, 1991, Cell 65 :973-982 ;Attisano 等人, 1992, Cell 68 :97-108)。除了活化素外, ActRIIa 和 ActRIIb 能够与数种其它的 TGF- β 家族蛋白 (包括 BMP7、Nodal、GDF8 和 GDF11) 进行生化相互作用 (Yamashita 等人, 1995, J. Cell Biol. 130 :217-226 ;Lee 和 McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98 :9306-9311 ;Yeo 和 Whitman, 2001, Mol. Cell 7 :949-957 ;Oh 等人, 2002, Genes Dev. 16 :2749-54)。ALK4 是活化素 (特别是活化素 A) 的主要的 I 型受体, 而 ALK-7 也可用作活化素 (特别是活化素 B) 的受体。

[0029] 如本文所述, 相对其它 TGF- β 家族成员 (例如 GDF8 或 GDF11) 明显优先结合活化素 A 的可溶性 ActRIIa 多肽 (sActRIIa) 可用于治疗或预防癌症, 特别是乳腺癌。虽然不希望受到任何具体机制的束缚, 假定在这些研究中所用的具体 sActRIIa 构建体显示极强的活化素结合 (皮摩尔解离常数), 预期 sActRIIa 的作用主要由活化素拮抗剂作用所引起。活化素-ActRIIa 拮抗剂包括, 例如, 活化素-结合的可溶性 ActRIIa 多肽、结合活化素 (具体来说活化素 A 和 B 亚基, 也称为 β_A 和 β_B) 并破坏 ActRIIa 结合的抗体、结合 ActRIIa 并破坏活化素结合的抗体、选择用于活化素或 ActRIIa 结合的非抗体蛋白 (此类蛋白及其设计和选择的方法的实例参见例如 WO/2002/088171、WO/2006/055689 和 WO/2002/032925)、选择用于活化素或 ActRIIa 结合的随机化的肽, 通常附着在 Fc 结构域上。具有活化素或 ActRIIa 结合活性的两种不同蛋白 (或其它部分), 特别是分别阻断 I 型 (例如可溶性 I 型活化素受体) 和 II 型 (例如可溶性 II 型活化素受体) 结合位点的活化素结合剂, 可连接在一起创建双功能结合分子。抑制该活化素-ActRIIa 信号传导轴的核酸适体、小分子和其

它药剂也可使用。各种蛋白具有活化素-ActRIIa拮抗剂活性,包括抑制素(即抑制素 α 亚基)(尽管抑制素并不在所有的组织中普遍拮抗活化素)、促滤泡抑制素(例如促滤泡抑制素-288和促滤泡抑制素-315)、FSRP、活化素C、 $\alpha(2)$ -巨球蛋白、以及M108A(在位置108处由蛋氨酸突变为丙氨酸)突变活化素A。一般而言,活化素的替代形式(特别是在I型受体结合结构域中具有替代的那些形式)能够结合II型受体且不能形成活性三元复合物,因此充当拮抗剂。此外,抑制活化素A、B、C或E或者尤其抑制ActRIIa表达的核酸,例如反义分子、siRNA或核酶可被用作活化素-ActRII拮抗剂。待使用的活化素-ActRIIa拮抗剂相对于其它TGF- β 家族成员,特别是相对于GDF8和GDF11,可对抑制活化素介导的信号传导显示选择性。可溶性ActRIIb蛋白确实与活化素结合,但是该野生型蛋白相对于GDF8/11不显示出对结合活化素的显著选择性。虽然如此,此类ActRIIb多肽,以及具有不同结合特性的ActRIIb的变化形式(参见,例如WO 2006/012627, pp. 55-59,在此引入作为参考),可对癌细胞实现所需的作用。通过与另一种活化素选择性结合剂偶联,天然的或变化的ActRIIb可获得增加的对活化素的特异性。

[0030] 在本发明的上下文中以及在每个术语所用的特定的上下文中,在本说明书中所用的术语通常具有其在本领域中的普通含义。在下文以及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该术语所用的特定上下文变得显而易见。

[0031] “大约”和“约”一般指在给定测量法的性质和精确性的前提下测得数值的可接受误差程度。典型地,示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。

[0032] 或者,特别是在生物系统中,术语“大约”和“约”可表示在一定数量级范围内,优选在给定值的5倍以内,更优选在2倍以内的平均值。除非另有说明,本文给出的数量为近似值,表示在未明确指出时,可推出术语“大约”或“约”。

[0033] 本发明的方法可包括对序列彼此比较的步骤,包括将野生型序列与一种或多种突变体(序列变体)进行比较。此类比较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,稍加举例,BLAST、FASTA和MEGALIGN)进行。本领域技术人员可容易地理解:在此类比对中,当突变包含残基插入或删除时,该序列比对将在不包含该插入或删除残基的聚合物序列中引入“间隙”(通常由破折号或“A”表示)。

[0034] “同源性”及其所有的语法形式和拼写变体均指具有“共同进化起源”的两种蛋白(包括来自相同生物物种的超家族的蛋白,以及来自不同生物物种的同源性蛋白)之间的关系。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,不管是就百分比同一性而言还是在通过特定残基或基序以及保守位置的存在方面。

[0035] 术语“序列相似性”及其所有的语法形式指可享有或可不享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。

[0036] 然而,在通常的使用以及在本申请中,当术语“同源性”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。

[0037] 术语“乳腺癌”指乳腺的任何增殖性病变或增殖性异常,其包括,例如,良性病变、恶化前和恶性病变、实体肿瘤以及转移性疾病(局部转移,例如III期,和更广泛的转移,例如IV期)。乳腺癌包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、乳腺髓样癌、乳腺粘

液腺癌、乳腺小管癌、乳头乳腺癌、佩吉特氏病以及炎性乳腺癌。乳腺癌还指源于乳腺转移性病变的其它器官（例如肺、肝和骨骼）疾病。乳腺癌还包括激素应答性和激素非依赖性癌症。一般而言，激素非依赖性乳腺癌的特征是雌激素和 / 或孕酮受体水平的缺失或降低，并且这些癌症典型地对用抗激素（特别是抗雌激素）疗法的治疗具有顽固性。乳腺癌还以 Her2 表达为基础分类，其中 Her2⁺ 肿瘤比 Her2⁻ 肿瘤的预后更差。

[0038] 2. ActRIIa 多肽

[0039] 在某些方面，本发明涉及使用 ActRIIa 多肽治疗或预防乳腺癌的方法。本文所用的术语“ActRIIa”指来自任意物种的 IIa 型活化素受体 (ActRIIa) 蛋白以及通过突变或其它修饰从该 ActRIIa 蛋白衍生的变体的家族。本文提及 ActRIIa 时，应理解为提及目前鉴定的形式中的任意一种。该 ActRIIa 家族的成员通常为跨膜蛋白，由具有富含半胱氨酸区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 / 苏氨酸激酶活性的细胞质结构域所组成。

[0040] 术语“ActRIIa 多肽”包括包含任何天然存在的 ActRIIa 家族成员多肽及其保留了有用活性的任意变体（包括突变体、片段、融合体以及拟肽形式）的多肽。参见，例如 WO/2006/012627。例如，ActRIIa 多肽包括由任意已知 ActRIIa 的序列所衍生的多肽，其中该已知 ActRIIa 具有与 ActRIIa 多肽序列有至少 80% 同一性、任选至少 85%、90%、95%、97%、99% 或更高同一性的序列。例如，本发明的 ActRIIa 多肽可结合 ActRIIa 蛋白和 / 或活化素并抑制其功能。可根据在体内抑制癌细胞增殖或存活的活性选择 ActRIIa 多肽。ActRIIa 多肽的实例包括人 ActRIIa 前体多肽 (SEQ ID NO :1) 和可溶性人 ActRIIa 多肽（例如，SEQ ID NOs :2、3、7 和 12）。

[0041] 人 ActRIIa 前体蛋白序列如下：

[0042] M G A A A K L A F A V F L I S C S S G A **ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP**
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP YYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKM
 AYPPVLVPTQDPGPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFVCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKH
 ENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISH
 RDIKSKNVLLKNNLTACIADDFGLALKFEAGKSAGDTHGQVQTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWEL
 ASRCTAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGC
 VGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO :1)

[0043] 信号肽以单下划线表示；胞外结构域以粗体表示，而潜在的 N- 连接的糖基化位点以双下划线表示。

[0044] 人 ActRIIa 可溶性（胞外）、加工的多肽序列如下：

[0045] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSN PVTPKPP (SEQ ID NO :2)

[0046] 应注意经实验确定 N- 末端序列以“ILG...”起始，并且与文献中通常主张的“AIL...” N- 末端序列不同。胞外结构域的 C- 末端“尾部”以下划线表示。删除“尾部”的序列 (A15 序列) 表示如下：

[0047] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO :3)

[0048] 编码人 ActRIIa 前体蛋白的核酸序列 (Genbank 条目 NM_001616 的核苷酸 164-1705) 如下:

[0049] ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGT
AGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACC
GTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGA
AACAAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTA
TATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCAC
TTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGG
GGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGAC
CCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGGGGAAGATT
TGGTTGTGTCTGGAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCAT
GGCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCTTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAA
CGAGGCACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTATCAGACTTTCTTAA
GGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGG
ATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAA
AACAACTGACAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCA
TGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATAGAGGGTGTATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTT
TGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTA
GATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCA
TAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAG
AATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTA
ACAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATC
TAGTCTATGA (SEQ ID NO :4)

[0050] 编码人 ActRIIa 可溶性 (胞外) 多肽的核酸序列如下:

[0051] ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAAT
CAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
TTCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAA
AAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATG
GAAGTCACACAGCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ IDNO :5)

[0052] 在具体的实施方案中,本发明涉及使用可溶性 ActRIIa 多肽治疗或预防乳腺癌的方法。本文所述的术语“可溶性 ActRIIa 多肽”通常指包含 ActRIIa 蛋白的胞外结构域的多肽。本文所用的术语“可溶性 ActRIIa 多肽”包括任何天然存在的 ActRIIa 蛋白及其任何变体 (包括突变体、片段以及拟肽形式) 的胞外结构域。活化素 - 结合 ActRIIa 多肽是一种保留了与活化素 (包括例如,活化素 AA、AB、BB 或包含 C 或 E 亚基的形式) 结合的能力的多肽。活化素 - 结合 ActRIIa 多肽将任选以 1nM 或更小的解离常数与活化素 AA 结合。ActRIIa 蛋白的胞外结构域与活化素结合,并通常为可溶的,因此可被称为可溶性、活化素 - 结合 ActRIIa 多肽。可溶性、活化素 - 结合 ActRIIa 多肽的实例包括 SEQ ID NOs :2、3、7、12 和 13 所示的可溶性多肽。SEQ ID NO :7 被称为 ActRIIa-hFc,并在实施例中进行进一步描述。可溶性、活化素 - 结合 ActRIIa 多肽的其它实例包含 ActRIIa 蛋白胞外结构域以外

的信号序列,例如,蜜蜂蜂毒肽前导序列 (SEQ ID NO :8)、组织纤溶酶原激活物 (TPA) 前导序列 (SEQ ID NO :9) 或天然 ActRIIa 前导序列 (SEQ ID NO :10)。在 SEQ ID NO :13 中所示的 ActRIIa-hFc 多肽采用 tPA 前导序列。

[0053] ActRIIa 多肽的功能活性片段可通过筛选从编码 ActRIIa 多肽的核酸的相应片段重组生成的多肽获得。此外,可采用本领域已知技术 (如常规的 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化学) 来化学合成片段。可 (通过重组或化学合成) 生成该片段并进行测试,以鉴定能够充当 ActRIIa 蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂 (抑制剂) 的那些肽基片段。

[0054] ActRIIa 多肽的功能活性变体可通过从编码 ActRIIa 多肽的相应突变核酸重组生成的经修饰的多肽库中筛选获得。可生成该变体并进行测试,以鉴定能够充当 ActRIIa 蛋白或活化素介导的信号传导的拮抗剂 (抑制剂) 的那些变体。在某些实施方案中,ActRIIa 多肽的功能变体包含与选自 SEQ ID NO :2 或 3 的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。在某些情况下,该功能变体具有与选自 SEQ ID NO :2 或 3 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

[0055] 功能变体可通过为诸如增强治疗效力或稳定性 (例如,先体外后体内保存期以及对体内蛋白酶降解的耐受性) 等目的对 ActRIIa 多肽的结构进行修饰来生成。在选择保留活化素结合时,此类修饰的 ActRIIa 多肽被认为是天然存在的 ActRIIa 多肽的功能等价物。修饰的 ActRIIa 多肽还可通过例如,氨基酸置换、删除或添加来生成。例如,可以合理预期单独的以异亮氨酸或缬氨酸置换亮氨酸、以谷氨酸置换天冬氨酸、以丝氨酸置换苏氨酸或以结构相关氨基酸进行的类似氨基酸置换 (例如,保守突变) 将不对所得分子的生物活性产生较大的影响。保守置换是发生在其侧链相关的氨基酸家族内的那些置换。在 ActRIIa 多肽的氨基酸序列中的变化是否产生功能性同系物可通过评估 ActRIIa 多肽变体在细胞中以类似于野生型 ActRIIa 多肽的方式产生应答的能力容易地测定。

[0056] 在某些实施方案中,本发明预期使用具有改变该多肽的糖基化的特定突变的 ActRIIa 多肽来治疗或预防乳腺癌的方法。可对此类突变进行选择,以便引入或消除一个或多个糖基化位点,例如 O-连接的或 N-连接的糖基化位点。天冬酰胺-连接的糖基化识别位点通常包含三肽序列,天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸 (其中“X”为任意氨基酸),其被适当的细胞糖基化酶特异性识别。还可通过对野生型 ActRIIa 多肽序列进行一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或置换 (针对 O-连接的糖基化位点) 来进行这种改变。在糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置之一或两者进行的各种氨基酸置换或删除 (和/或在第二位置的氨基酸删除) 导致在修饰的三肽序列处的非糖基化。增加 ActRIIa 多肽上的糖部分的数量的一种方式是通过将糖苷化学或酶促偶联至该 ActRIIa 多肽。根据所用的偶联模式,该糖可被连接至 (a) 精氨酸和组氨酸; (b) 游离羧基基团; (c) 游离巯基基团,例如半胱氨酸中的那些巯基; (d) 游离羟基基团,例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸中的那些羟基; (e) 芳族残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸中的那些芳族残基; 或者 (f) 谷氨酰胺中的酰胺基团。可通过化学和/或酶促法来实现将存在于 ActRIIa 多肽上的一个或多个糖部分去除。化学去糖基化可涉及,例如,将 ActRIIa 多肽暴露至化合物三氟甲磺酸或同等的化合物。该处理导致除了连接糖 (N-乙酰基葡萄糖胺或 N-乙酰基半乳糖胺) 以外大部分或全部糖的裂解,同时保持氨基酸序列完整。ActRIIa 多肽上的糖部分的酶促裂解可通过采用 Thotakura 等人 (1987) Meth. Enzymol. 138 :350 所述的各种内切和外切糖苷酶来

实现。适当时,ActRIIa 多肽的序列可根据所用表达系统的类型进行调整,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可导入可受到肽的氨基酸序列影响的不同的糖基化类型 (pattern)。一般而言,虽然其它的哺乳动物表达细胞系也预期有用,但是用于人类的 ActRIIa 蛋白可在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系 (例如 HEK293 或 CHO 细胞系) 中表达。

[0057] 本公开内容进一步预期生成突变体的方法,特别是生成 ActRIIa 多肽的组合突变体和截短突变体的方法;组合突变体集合对于鉴定功能变体序列特别有用。筛选此类组合库的目的可以是生成例如结合活化素或其它配体的 ActRIIa 多肽变体。下文提供了各种筛选分析,此类分析可用于评估变体。例如,可针对结合 ActRIIa 配体的能力筛选 ActRIIa 多肽变体,以防止 ActRIIa 配体与 ActRIIa 多肽结合或者干扰 ActRIIa 配体引起的信号传导。

[0058] ActRIIa 多肽或其变体的活性也可在基于细胞的测定或体内测定中进行测试。例如,可以评估 ActRIIa 多肽变体对癌细胞增殖或存活的影响。癌细胞可指在活体对象中构成实体肿瘤的细胞或者在活体对象中来源于肿瘤并扩散到其它部位的细胞 (即,转移细胞)。此外,癌细胞可指得自或源自肿瘤或癌生长并在体外培养的细胞。癌细胞还包括例如,可在体外培养或用于动物异种移植研究的细胞系。癌细胞还指通过转移后的细胞分裂来自转移细胞的细胞。所述细胞可以是激素应答的 (例如雌激素受体阳性) 或激素非依赖性的 (例如雌激素受体阴性)。癌细胞增殖或存活可以在一种或多种重组 ActRIIa 配体蛋白 (例如活化素) 的存在下进行评估,且可转染细胞以生成 ActRIIa 多肽和 / 或其变体,以及任选的 ActRIIa 配体。同样地,可对小鼠或其它动物给予 ActRIIa 多肽,并进行一种或多种测量,例如可以评估肿瘤尺寸、或者相对于对照的细胞增殖或凋亡速率。

[0059] 可生成相对于天然存在的 ActRIIa 多肽具有选择性或通常提高的效力的源自组合的变体 (Combinatorially-derived variants)。同样地,突变可产生变体,该变体的胞内半衰期明显不同于相应的野生型 ActRIIa 多肽。例如,该改变的蛋白可使蛋白酶降解或其它导致天然 ActRIIa 多肽的破坏或其它形式失活的细胞过程更加稳定或更加不稳定。此类变体以及编码它们的基因可用于通过调节 ActRIIa 多肽的半衰期来改变 ActRIIa 多肽水平。例如,短的半衰期可以产生更为短暂的生物学效应,并对于部分的可诱导表达系统,可允许更紧密地控制细胞中的重组 ActRIIa 多肽水平。在 Fc 融合蛋白中,可在接头 (如果有) 和 / 或 Fc 部分进行突变以改变蛋白的半衰期。

[0060] 可通过编码多肽库的基因的简并库产生组合库,所述每个多肽包含至少一部分的潜在 ActRIIa 多肽序列。例如,可将合成的寡核苷酸混合物酶促连接入基因序列中,从而使潜在 ActRIIa 多肽核苷酸序列的简并组能作为单独多肽进行表达,或者,作为更大的融合蛋白组进行表达 (例如针对噬菌体展示)。

[0061] 可通过多种方式从简并寡核苷酸序列生成潜在同系物的库。简并基因序列的化学合成可在自动 DNA 合成仪中进行,然后可将合成的基因连接入适当的表达用载体中。简并寡核苷酸的合成为本领域熟知 (例如参见 Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39 :3 ;Itakura 等人, (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, AG Walton 编, Amsterdam :Elsevier pp273-289 ;Itakura 等人, (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53 :323 ; Itakura 等人, (1984) *Science* 198 :1056 ;Ike 等人, (1983) *Nucleic Acid Res.* 11 :477)。此类技术已经被用于其它蛋白的定向进化中 (例如参见 Scott 等人, (1990) *Science* 249 :

386-390 ;Roberts 等 人, (1992)PNASUSA 89 :2429-2433 ;Devlin 等 人, (1990)Science 249 :404-406 ;Cwirla 等人, (1990)PNAS USA 87 :6378-6382 ;以及美国专利 5, 223, 409、5, 198, 346 和 5, 096, 815)。

[0062] 或者,可采用其它的突变形式来生成组合库。例如,可通过如下方式生成和从库中筛选分离 ActRIIa 多肽变体,例如,丙氨酸分区突变等 (Ruf 等人, (1994)Biochemistry 33 :1565-1572 ;Wang 等 人, (1994)J. Biol. Chem. 269 :3095-3099 ;Balint 等 人, (1993)Gene 137 :109-118 ;Grodberg 等 人, (1993)Eur. J. Biochem. 218 :597-601 ;Nagashima 等 人, (1993)J. Biol. Chem. 268 :2888-2892 ;Lowman 等 人, (1991)Biochemistry 30 :10832-10838 ;以及 Cunningham 等人, (1989)Science 244 :1081-1085)、接头分区突变 (Gustin 等人, (1993)Virology 193 :653-660 ;Brown 等人, (1992)Mol. Cell Biol. 12 :2644-2652 ;McKnight 等人, (1982)Science 232 :316)、饱和突变 (Meyers 等人, (1986)Science 232 :613)、PCR突变 (Leung 等人, (1989)Method CellMol Biol 1 :11-19) ;或者随机突变,包括化学突变等 (Miller 等人, (1992)A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY ;以及 Greener 等人, (1994)Strategies in Mol Biol 7 :32-34)。接头分区突变 (特别是在组合设置中) 是一种具有吸引力的鉴定截短 (生物活性) 形式的 ActRIIa 多肽的方法。

[0063] 本领域已知用于筛选通过点突变和截短得到的组合库中的基因产品,以及就此而言,用于筛选具有某种特性的基因产品的 cDNA 库的各种技术。此类技术通常适用于通过 ActRIIa 多肽组合突变生成的基因库的快速筛选。筛选大型基因库最广泛使用的技术通常包括将该基因库克隆进入可复制的表达载体,用所得的载体库转化适当的细胞,并在其中所需活性的检测促使编码所检测的产物的基因的载体相对容易分离的条件下表达组合基因。优选的测定包括活化素结合测定和活化素介导的细胞信号传导测定。

[0064] 在某些实施方案中,在本文所述方法中有用的 ActRIIa 多肽可进一步包括在 ActRIIa 多肽中天然存在的任意修饰之外的翻译后修饰。这些修饰包括,但不限于,乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化 (lipidation) 和酰化。结果是,修饰的 ActRIIa 多肽可包含非氨基酸元件,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸酯 / 盐。此类非氨基酸元件对 ActRIIa 多肽功能的影响可如本文对于其它 ActRIIa 多肽变体所述进行测试。当通过裂解 ActRIIa 多肽的新生形式在细胞中生成 ActRIIa 多肽时,翻译后加工也可对蛋白的正确折叠和 / 或功能重要。不同的细胞 (例如 CHO、HeLa、MDCK、WI38、NIH-3T3 或 HEK293) 对于此类翻译后活动具有特定的细胞结构 (cellular machinery) 和特征机制,并可被选择以确保 ActRIIa 多肽的正确修饰和加工。

[0065] 在某些方面,ActRIIa 多肽的功能变体或修饰形式包括具有至少一部分 ActRIIa 多肽和一种或多种融合结构域的融合蛋白。众所周知的此类融合结构域的实例包括但不限于聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)、硫氧还蛋白、A 蛋白、G 蛋白、免疫球蛋白重链恒定区 (Fc)、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 或人血清白蛋白。可选择融合结构域来赋予所需的特性。例如,一些融合结构域特别有用于通过亲和色谱分离融合蛋白。就亲和纯化而言,使用亲和色谱用的相关基质,例如谷胱甘肽 -、淀粉酶 -、以及镍 - 或钴 - 缀合的树脂。许多此类基质可以“试剂盒”形式得到,例如 Pharmacia GST 纯化系统和 QIAexpress™ 系统 (Qiagen) 与有用的 (HIS₆) 融合伴侣。作为另一实例,可选择融合结构域以促进 ActRIIa 多

肽的检测。此类检测结构域的实例包括各种荧光蛋白（例如，GFP）以及“表位标记”，其通常为可获得特异性抗体的短肽序列。容易获得的特异性单克隆抗体的众所周知的表位标记包括 FLAG、流感病毒血细胞凝集素（HA）和 c-myc 标记。在一些情况下，融合结构域具有蛋白酶切割位点，例如对于 Xa 因子和凝血酶的切割位点，其允许相关的蛋白酶部分消化该融合蛋白，从而从中释放重组蛋白。释放的蛋白可随后通过后续的色谱分离从融合结构域中分离。在某些优选实施方案中，ActRIIa 多肽与在体内稳定 ActRIIa 多肽的结构域（“稳定剂”结构域）相融合。“稳定”表示增加血清半衰期的任意情况（anything），而不论这是否由破坏减少、肾脏清除率降低或其它药代动力学作用所引起。已知与免疫球蛋白的 Fc 部分的融合为各种蛋白赋予所需的药代动力学特性。同样地，与人血清白蛋白的融合可赋予所需特性。可供选择的其它融合结构域类型包括多聚（例如，二聚、四聚）结构域和功能结构域（其赋予另外的生物学功能）。

[0066] 作为具体的实例，本发明提供治疗或预防乳腺癌的方法，其使用包含与 Fc 结构域融合的 ActRIIa 的可溶性胞外结构域的融合蛋白（例如 SEQ IDNO :6）。

[0067] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK *

[0068] 任选地，Fc 结构域在例如 Asp-265、赖氨酸 322 和 Ash-434 等残基处具有一个或多个突变。在某些情况下，具有一个或多个这些突变（例如 Asp-265 突变）的突变体 Fc 结构域与 Fc γ 受体的结合能力相对于野生型 Fc 结构域有所下降。在其它情况下，具有一个或多个这些突变（例如 Asn-434 突变）的突变体 Fc 结构域与 I 类 MHC 相关 Fc 受体（FcRN）的结合能力相对于野生型 Fc 结构域有所上升。一般理解，Fc 结构域可包含更小或更大部分的免疫球蛋白恒定区，条件是所得的 Fc 结构域保留通过二硫键共价二聚的能力并形成相对稳定的可溶性蛋白。

[0069] 应理解该，融合蛋白的不同元件可以与所需功能一致的任意方式排列。例如，ActRIIa 多肽可置于异源结构域的 C- 末端，或者，异源结构域可置于 ActRIIa 多肽的 C- 末端。ActRIIa 多肽结构域和异源结构域无需在融合蛋白中相邻，在任一结构域的 C- 或 N- 末端或者在结构域之间可包含另外的结构域或氨基酸序列。

[0070] 在某些实施方案中，在本文所述方法中有用的 ActRIIa 多肽可包含能够稳定 ActRIIa 多肽的一种或多种修饰。例如，此类修饰提高 ActRIIa 多肽的体外半衰期，提高 ActRIIa 多肽的循环半衰期或减少 ActRIIa 多肽的蛋白酶降解。此类稳定修饰包括但不限于融合蛋白（包括，例如，包含 ActRIIa 多肽和稳定剂结构域的融合蛋白）、糖基化位点的修饰（包括，例如，向 ActRIIa 多肽附加糖基化位点）以及碳水化合物部分的修饰（包括，例如，从 ActRIIa 多肽除去碳水化合物部分）。本文所用的术语“稳定剂结构域”不仅指融合蛋白情况下的融合结构域（例如 Fc），还包括非蛋白质修饰，例如碳水化合物部分，或非蛋白质部分，例如聚乙二醇。

[0071] 在某些实施方案中，本文所述方法使用 ActRIIa 多肽的分离和 / 或纯化形式，其分离自其他蛋白，或者基本不含其它蛋白。ActRIIa 多肽通常通过从重组核酸表达而产生。

[0072] 3. 编码 ActRIIa 多肽的核酸

[0073] 本文提供编码本文公开的任意 ActRIIa 多肽（例如可溶性 ActRIIa 多肽），包括片段、功能变体和融合蛋白的分离和 / 或重组核酸。例如，SEQ ID NO :4 编码天然存在的人 ActRIIa 前体多肽，而 SEQ ID NO :5 编码加工的 ActRIIa 胞外结构域。目标 (subject) 核酸可以是单链的或是双链的。这样的核酸可以是 DNA 或 RNA 分子。这些核酸可以在，例如，制备 ActRIIa 多肽的方法中使用，或者直接用作治疗剂（例如在基因疗法中）。

[0074] 在某些方面，编码 ActRIIa 多肽的目标核酸应进一步理解为包括为 SEQ ID NO :4 或 5 的变体的核酸。变体核苷酸序列包括通过一个或多个核苷酸置换、添加或删除加以区别的序列，例如等位基因变体。

[0075] 在某些实施方案中，本发明提供治疗或预防乳腺癌的方法，其使用与 SEQ ID NO :4 或 5 具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的分离或重组核酸序列。本领域普通技术人员将理解：与 SEQ ID NO :4 或 5 互补的核酸序列、以及 SEQ ID NO :4 或 5 的变体同样在本发明的范围之内。在进一步的实施方案中，本文所述核酸序列可被分离、重组和 / 或与异源核苷酸序列融合，或者在 DNA 库中。

[0076] 在其它实施方案中，在本文所述方法中有用的核酸还包括在高度严格的条件下与 SEQ ID NO :4 或 5 所示的核苷酸序列、SEQ ID NO :4 或 5 的互补序列或其片段进行杂交的核苷酸序列。本领域普通技术人员将容易理解：促进 DNA 杂交的合适的严格条件是可以变化的。例如，可在 6.0x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC)、约 45°C 下进行杂交，然后在 2.0x SSC、50°C 下洗涤。例如，洗涤步骤中的可选择盐浓度从低严格性的约 2.0x SSC、50°C 至高严格性的约 0.2x SSC、50°C。此外，洗涤步骤中的温度可从低严格条件的室温（约 22°C）上升至高严格条件的约 65°C。温度和盐可都变化，或者可将温度或盐浓度之一保持恒定，而改变另一变量。在一种实施方案中，本文所述方法中使用的核酸在 6x SSC、室温的低严格条件下杂交，然后在 2x SSC、室温下洗涤。

[0077] 由于遗传密码的简并性而不同于 SEQ ID NO :4 或 5 所示核酸的分离核酸也考虑用于本文所述的方法中。例如，许多氨基酸由超过一个的三联体所表示。表示相同氨基酸的密码子，或同义密码子（例如，CAU 和 CAC 为组氨酸的同义密码子）可导致不影响蛋白的氨基酸序列的“沉默”突变。然而，预期在哺乳动物细胞中存在确实导致目标蛋白的氨基酸序列变化的 DNA 序列多态性。本领域技术人员将理解：编码特定蛋白的核酸中的一个或多个核苷酸（至多约 3-5% 的核苷酸）的这些变异由于天然等位基因变异可在给定物种的个体中存在。任何或全部的此类核苷酸变异以及所产生的氨基酸多态性均在本发明的范围之内。

[0078] 在某些实施方案中，本文所述的重组核酸可以在表达构建体中可操作地连接至一种或多种调节性核苷酸序列。调节性核苷酸序列通常适合用于表达的宿主细胞。本领域已知用于各种宿主细胞的多种类型的合适的表达载体以及合适的调节性序列。所述一种或多种调节性核苷酸序列通常可包括但不限于启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或活化子序列。本发明考虑本领域已知的组成型或可诱导启动子。所述启动子可以是天然存在的启动子，或者是合并超过一个启动子的元件的杂交启动子。表达构建体可存在于细胞中的游离体（例如质粒）上，或者表达构建体可插入染色体中。在优选的实施方案中，表达载体包含可选择的标记基因，以允许选择转化的宿主细胞。可选择的标记基因为本领域所熟知，并将随着所使用的宿主细胞而变化。

[0079] 在某些方面,本文所述方法使用包含编码 ActRIIa 多肽并可操作地连接到至少一个调节性序列的核苷酸序列的表达载体。调节性序列为本领域所了解,并被选择来引导 ActRIIa 多肽的表达。因此,术语调节性序列包括启动子、增强子以及其它表达控制元件。示例性的调节性序列描述于 Goeddel ;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,CA(1990) 中。例如,可在这些载体中使用各种在与 DNA 序列可操作地连接时控制该 DNA 序列表达的表达控制序列中的任意一种,以表达编码 ActRIIa 多肽的 DNA 序列。此类有用的表达控制序列包括,例如,SV40 的早期和晚期启动子、tet 启动子、腺病毒和巨细胞病毒立即早期启动子、RSV 启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、由 T7RNA 聚合酶引导表达的 T7 启动子、 λ 噬菌体的主要操纵子和启动子区、fd 包被蛋白 (coat protein) 的控制区、3- 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子 (例如 Pho5)、酵母 α - 交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子以及已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列,及其各种组合。应当理解,表达载体的设计可取决于诸如待转化宿主细胞的选择和 / 或需要表达的蛋白类型等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力以及由该载体编码的任何其它蛋白 (例如抗生素标记) 的表达。

[0080] 可通过将克隆的基因或其部分连接入适合在原核细胞、真核细胞 (酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物) 或两者中表达的载体中产生本文所述的重组核酸。用于生产重组 ActRIIa 多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括如下类型的质粒:用于在原核细胞 (例如大肠杆菌) 中表达的 pBR322- 衍生质粒、pEMBL- 衍生质粒、pEX- 衍生质粒、pBTac- 衍生质粒以及 pUC- 衍生质粒。

[0081] 一些哺乳动物表达载体同时包含促进载体在细菌中繁殖的原核序列和一种或多种在真核细胞中表达的真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 和 pHyg 衍生载体是适合真核细胞转染的哺乳动物细胞表达载体的实例。这些载体中的一些用来自细菌质粒 (如 pBR322) 的序列进行修饰,以促进在原核和真核细胞中的复制和药物抗性选择。或者,病毒的衍生物如牛乳头瘤病毒 (BPV-1) 或 Epstein-Barr 病毒 (pHEBo、pREP- 衍生的和 p205) 可用于在真核细胞中蛋白的瞬时表达。其它病毒 (包括逆转录病毒) 表达系统的实例可在下文基因治疗传递系统的描述中找到。制备质粒和转化宿主生物所采用的各种方法为本领域熟知。其它合适原核和真核细胞两者的表达系统以及一般的重组步骤参见 Molecular CloningA Laboratory Manual, 第三版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编 (ColdSpring Harbor Laboratory Press,2001)。在某些情况下,可能需要采用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。此类杆状病毒表达系统的实例包括 pVL- 衍生载体 (例如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941)、pAcUW- 衍生载体 (例如 pAcUW1) 以及 pBlueBac- 衍生载体 (例如含 β -gal 的 pBlueBac III)。

[0082] 在优选的实施方案中,设计载体用于在 CHO 细胞中产生目标 ActRIIa 多肽,例如 Pcmv-Script 载体 (Stratagene, La Jolla, Calif)、pcDNA4 载体 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 和 pCI-neo 载体 (Promega, Madison, Wisc)。显而易见地,目标基因构建体可用于引起目标 ActRIIa 多肽在培养物中繁殖的细胞中表达,例如,以产生蛋白,包括融合蛋白或变体蛋白,以供纯化。

[0083] 本公开内容还涉及用包含一种或多种目标 ActRIIa 多肽的编码序列（例如，SEQ ID NO :4 或 5）的重组基因转染的宿主细胞。所述宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如，本文所述的 ActRIIa 多肽可在细菌细胞（如大肠杆菌）、昆虫细胞（例如采用杆状病毒表达系统）、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞为本领域技术人员所已知。

[0084] 本文还提供制备目标 ActRIIa 多肽的方法。例如，用编码 ActRIIa 多肽的表达载体转染的宿主细胞可在适当条件下培养，以允许发生 ActRIIa 多肽表达。ActRIIa 多肽可被分泌并从细胞和含有 ActRIIa 多肽的培养基的混合物中分离。或者，ActRIIa 多肽可保留在细胞质内或者在膜组分中，收获、裂解细胞并分离蛋白。细胞培养物包含宿主细胞、培养基和其它副产品。细胞培养的合适培养基为本领域熟知。采用本领域已知的纯化蛋白的技术，可将目标 ActRIIa 多肽从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离，所述技术包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳、采用 ActRIIa 多肽的特定表位的特异性抗体的免疫亲和纯化、以及采用与 ActRIIa 多肽融合的结构域结合的试剂的亲和纯化（例如，A 蛋白柱可用于纯化 ActRIIa-Fc 融合体）。在优选的实施方案中，ActRIIa 多肽是包含促进其纯化的结构域的融合蛋白。在优选的实施方案中，通过一系列的柱色谱步骤实现纯化，包括，例如，以任意顺序的三种或更多的以下步骤：A 蛋白色谱、Q 琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱以及阳离子交换色谱。纯化可通过病毒过滤和缓冲液交换完成。如本文所证明，ActRIIa-hFc 蛋白被纯化至通过尺寸排阻色谱测定 > 98%，且用 SDS PAGE 测定 > 95% 的纯度。该纯度水平足以在小鼠、大鼠和非人灵长动物中实现所需的结果。

[0085] 在另一实施方案中，编码纯化前导序列（例如在重组 ActRIIa 多肽的所需部分 N 末端处的聚组氨酸 / 肠激酶切割位点序列）的融合基因，可允许采用 Ni²⁺ 金属树脂通过亲和色谱来纯化所表达的融合蛋白。然后该纯化前导序列可通过用肠激酶处理去除，以提供纯化的 ActRIIa 多肽（例如，参见 Hochuli 等人，(1987) J. Chromatography 411 :177；和 Janknecht 等人，PNAS USA 88 :8972）。

[0086] 制备融合基因的技术是众所周知的。实质上，按照常规技术将编码不同多肽序列的各种 DNA 片段连接，采用平头 (blunt-ended) 或交错 (stagger-ended) 末端进行连接，限制性酶消化以提供合适的末端，适当时填补粘性末端，碱性磷酸酶处理以避免不想要的连接，以及酶连接。在另一实施方案中，融合基因可通过包括自动 DNA 合成仪等常规技术来合成。或者，可使用在两个连续基因片段之间产生互补性悬挂的锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增，此两个连续基因片段随后可退火形成嵌合基因序列（例如，参见 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等人编，John Wiley & Sons :1992）。

[0087] 4. 替代性活化素 (alternative activin) 和 ActRIIa 拮抗剂

[0088] 本公开内容涉及使用活化素 -ActRIIa 信号传导的拮抗剂治疗或预防乳腺癌的方法。尽管可溶性 ActRIIa 多肽，特别是 ActRIIa-Fc 是优选的拮抗剂，且尽管此类拮抗剂可通过不同于活化素拮抗的机制影响乳腺癌细胞生长或存活（例如，活化素抑制可以是一种药剂抑制一系列分子活性的倾向的指示剂，所述分子有可能包括 TGF- β 超家族的其它成员，且此类集体抑制可导致对乳腺癌细胞生长或存活的所需影响），其它类型的活化素 -ActRIIa 拮抗剂预期也是有用的，包括抗活化素（例如，活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 和 β_D ）抗体，抗 ActRIIa 抗体，抑制 ActRIIa 产生的反义、RNAi 或核酶核酸，以及其它的活化素或 ActRIIa 抑制剂，特别是破坏活化素 -ActRIIa 结合的那些抑制剂。在某些实施方案中，对活

化素 B 有特异性的拮抗剂（例如抗活化素 B 抗体）在本发明的方法中是有用的。

[0089] 与 ActRIIa 多肽（例如可溶性 ActRIIa 多肽）特异性反应并与 ActRIIa 多肽竞争性结合配体或者其它形式抑制 ActRIIa 介导的信号传导的抗体可用作 ActRIIa 多肽活性的拮抗剂。同样地，与活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 或 β_E 多肽或其任何异源二聚体特异性反应并破坏 ActRIIa 结合的抗体可用作拮抗剂。

[0090] 使用由 ActRIIa 多肽或活化素多肽衍生的免疫原，可通过标准规程 (protocols) 制备抗蛋白 / 抗肽抗血清或单克隆抗体（参见，例如 *Antibodies :A Laboratory Manual*, Harlow 和 Lane 编 (Cold Spring Harbor Press :1988)）。哺乳动物如小鼠、仓鼠或兔可通过 ActRIIa 多肽的免疫原形式、能够引发抗体应答的抗原性片段，或融合蛋白进行免疫。给蛋白或肽赋予免疫原性的技术包括与载体缀合或本领域熟知的其它技术。可在佐剂的存在下给予 ActRIIa 或活化素多肽的免疫原部分。免疫的进展可通过检测血浆或血清中的抗体滴度进行监测。标准的 ELISA 或其它免疫测定可用于以免疫原作为抗原评估抗体水平。

[0091] 在用 ActRIIa 多肽的抗原性制剂免疫动物后可获得抗血清，且在需要时可从该血清中分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体，可从免疫的动物采集抗体生成细胞（淋巴细胞），并通过标准的体细胞融合步骤与永生化细胞（如骨髓瘤细胞）融合以获得杂交瘤细胞。此类技术为本领域熟知，其包括，例如，杂交瘤技术（最初由 Kohler 和 Milstein 开发，(1975) *Nature*, 256 :495-497）、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbar 等人，(1983) *Immunology Today*, 4 :72)、以及产生人单克隆抗体的 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等人，(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)。可通过免疫化学筛选用于产生与 ActRIIa 多肽特异性反应的抗体的杂交瘤细胞，并从包含该种杂交瘤细胞的培养物分离单克隆抗体。还可通过筛选抗体可变区或 Fab 片段文库（例如噬菌体呈现文库）来产生抗体，以鉴定与选择的抗原（例如活化素或 ActRIIa）相结合的结合物。这种体外方法通常用于在哺乳动物（尤其是小鼠和人）之间高度保守的蛋白。

[0092] 本文所用的术语“抗体”意在包括完整的抗体，例如任意抗体同种型 (IgG、IgA、IgM、IgE 等)，并且包括与选择的抗原反应的免疫球蛋白的片段或结构域。抗体可使用常规技术片段化，并根据实用性和 / 或与感兴趣的特异性表位的相互作用筛选片段。因此，该术语包括能够与某种蛋白选择性反应的抗体分子的蛋白酶裂解片段或重组制备的部分。此类蛋白酶解和 / 或重组的片段的非限制性实例包括 Fab、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、Fv 以及包含通过肽接头连接的 V[L] 和 / 或 V[H] 结构域的单链抗体 (scFv)。scFv 可共价或非共价连接，以形成具有两个或更多个结合位点的抗体。术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体、或抗体和重组抗体的其它纯化制剂。术语“重组抗体”表示从使用分子生物学技术构建的核酸表达的抗体或免疫球蛋白的抗原结合结构域，例如从单链抗体开发的人源化抗体或全人源抗体。单结构域和单链抗体也包括在术语“重组抗体”之内。

[0093] 在某些实施方案中，本文所述方法可使用抗体，例如单克隆抗体。还提供了产生新型抗体的方法。例如，产生特异性结合 ActRIIa 多肽或活化素多肽的单克隆抗体的方法可包括给予小鼠一定量的免疫原性组合物（其包含有效刺激可检测免疫应答的抗原多肽），，从该小鼠获得产生抗体的细胞（例如来自脾的细胞）将该产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合，以获得产生抗体的杂交瘤，并测试该产生抗体的杂交瘤，以鉴定产生特异性结合该抗原的单克隆抗体的杂交瘤。一旦获得后，杂交瘤可在细胞培养物中繁殖，任选采用杂交瘤衍

生细胞产生特异性结合该抗原的单克隆抗体的培养条件。单克隆抗体可从细胞培养物中纯化。

[0094] 形容词“与... 特异性反应”在指代抗体时,如本领域通常理解的那样,有意表示抗体在感兴趣抗原(例如 ActRIIa 多肽)与其它非感兴趣抗原之间具有足够的选择性,使得该抗体至少有益于在具体类型的生物样本中检测该感兴趣抗原的存在。在使用抗体的某些方法中,例如治疗性应用中,可能需要更高层次的结合特异性。单克隆抗体通常具有更强的趋势(与多克隆抗体相比)有效区分所需的抗原和交叉反应性多肽(cross-reacting polypeptide)。影响抗体:抗原相互作用特异性的一个特征是抗体对该抗原的亲合性。尽管可通过一定范围的不同亲合性实现所需的特异性,一般优选抗体具有约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M 或更小的亲合性(解离常数)。

[0095] 此外,用于筛选抗体以鉴定所需抗体的技术可影响所得抗体的特性。例如,如果抗体用于在溶液中结合抗原,测试溶液结合可能是合意的。可利用各种不同的技术来测试抗体和抗原之间的相互作用,以鉴定具体所需的抗体。此类技术包括 ELISA、表面等离子体共振结合测定(例如, Biacore™ 结合测定, Biacore AB, 瑞典 Uppsala)、夹心测定(例如, 顺磁珠系统(paramagnetic bead system), IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland)、蛋白质印迹、免疫沉淀测定以及免疫组化。

[0096] 作为活化素或 ActRIIa 拮抗剂的核酸化合物类别的实例包括反义核酸、RNAi 构建体和催化性核酸(catalytic nucleic acid)构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可包含突出端(overhang)或非互补的区域,其中一条或另一条链为单链的。单链化合物可包含自身互补的区域,表示该化合物形成所谓的“发夹”或“茎环”结构,具有双链螺旋结构的区域。核酸化合物可包含与由全长 ActRIIa 核酸序列或活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 或 β_E 核酸序列的不超过 1000 个、不超过 500 个、不超过 250 个、不超过 100 个或不超过 50、35、25、22、20、18 或 15 个核苷酸组成的区域互补的核苷酸序列。互补区域优选至少 8 个核苷酸,并任选约 18 至 35 个核苷酸。互补区域可落入内含子中,后者是目标转录物的编码序列或非编码序列,例如编码序列部分。一般而言,核酸化合物具有约 8 至约 500 个核苷酸或碱基对的长度,且任选该长度为约 14 至约 50 个核苷酸。核酸可以是 DNA(特别是用作反义时)、RNA 或 RNA:DNA 杂交体。任意一条链可包括 DNA 和 RNA 的混合物以及不能简单分类为 DNA 或 RNA 的修饰形式。同样地,双链化合物可以是 DNA:DNA、DNA:RNA 或 RNA:RNA,且任意一条链也可包含 DNA 和 RNA 的混合物以及不能简单分类为 DNA 或 RNA 的修饰形式。核酸化合物可包含各种修饰的任意一种,包括对骨架(天然核酸中的糖-磷酸酯/盐部分,包括核苷酸间连锁)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一个或多个修饰。反义核酸化合物将优选具有约 15 至约 30 个核苷酸的长度,并通常包含一个或多个修饰以改善其特征,例如在血清、在细胞或在该化合物可能传递位置(例如口服传递化合物情况下的胃以及吸入化合物时的肺)中的稳定性。对于 RNAi 构建体的情况,与目标转录物互补的链通常为 RNA 或其修饰。另一条链可以是 RNA、DNA 或任意其它变体。双链或单链“发夹”RNAi 构建体的双链体部分通常具有 18-40 个核苷酸的长度,任选约 21-23 个核苷酸的长度,只要其用作 Dicer 酶底物。催化性或酶促性核酸可以是核酶或 DNA 酶,并且还可包含修饰的形式。核酸化合物可在生理条件下,在无义或有义控制影响很小或没有影响的浓度下与细胞接触时抑制约 50%、75%、90% 或更多的目标的表达。用于测试核酸化合物影响的优选浓度为 1、5

和 10 微摩尔。还可测试核酸化合物对例如,乳腺癌细胞或乳腺肿瘤的增殖或存活的影响。

[0097] 5. 筛选测定

[0098] 在某些方面,本发明涉及使用 ActRIIa 多肽(例如可溶性 ActRIIa 多肽)和活化素多肽鉴定作为活化素-ActRIIa 信号传导途径的激动剂或拮抗剂的化合物(药剂)。通过这种筛选鉴定的化合物可被测试,以评估它们在体内或体外调节癌细胞,特别是乳腺癌细胞生长或存活的能力。这些化合物可以在例如动物模型(如小鼠异种移植模型)中测试。一种有用的动物模型是鼠 MDA-MB231 乳腺癌模型;MDA-MB231 细胞不依赖于激素并易于向骨骼转移。例如通过以下方法可产生乳腺癌的其它动物模型:将大鼠神经母细胞瘤细胞(neu 癌基因最初从此细胞中分离)或 neu 转化的 NIH-3T3 细胞移植到裸小鼠中,基本如 Drebin 等人,Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9129-9133(1986)所述。

[0099] 有多种方法来筛选通过靶向活化素和 ActRIIa 信号传导来治疗或预防乳腺癌的治疗剂。在某些实施方案中,可进行化合物的高通量筛选来鉴定在选则的细胞系扰乱活化素或 ActRIIa 介导的影响的药剂。在某些实施方案中,实施该测定以筛选并鉴定特异性抑制或减少 ActRIIa 多肽与活化素结合的化合物。或者,该测定可用于鉴定增强 ActRIIa 多肽与活化素结合的化合物。在进一步的实施方案中,化合物可通过其与活化素或 ActRIIa 多肽相互作用的能力来鉴定。

[0100] 多种测定形式是足够的,但是根据本公开内容,那些未在本文明确描述的测定将被本领域普通技术人员所理解。如本文所述,测试化合物(药剂)可通过任意组合的化学方法制备。或者,目标化合物可以是在体内或体外合成的天然存在的生物分子。待测试其作为组织生长调节剂的能力的化合物(药剂)可通过例如细菌、酵母、植物或其它生物体产生(例如天然产物),通过化学产生(例如小分子,包括拟肽),或通过重组产生。本文考虑的测试化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、拟肽、糖、激素和核酸分子。在具体的实施方案中,测试药剂是分子量小于约 2000 道尔顿的有机小分子。

[0101] 测试化合物可以单个的、离散的实体提供,或者在更复杂的库中提供,例如通过组合化学制备。这些库可包含例如醇、卤代烷烃、胺、酰胺、酯、醛、醚以及其它有机化合物类别。测试化合物可在测试系统以分离形式或化合物的混合物形式存在,尤其是在初始的筛选步骤中。任选地,化合物任选可经其它化合物衍生,并具有促进该化合物分离的衍生基团。衍生基团的非限制性实例包括生物素、荧光素、地高辛、绿色荧光蛋白、同位素、聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、光激活交联剂或其任意组合。

[0102] 在许多对化合物和天然提取物库进行测试的药物筛选程序中,高通量测定是合意的,以便使给定时段内所考察的化合物数量达到最大化。在无细胞系统中进行的测定(例如可通过纯化或半纯化蛋白得到)通常优选作为“初级(primary)”筛选,因为可生成它们,以允许快速开发和相对容易地检测由测试化合物介导的分子目标的改变。此外,测试化合物的细胞毒性或生物利用度效应通常在体外系统中可被忽略,该测定转而主要集中在药物对分子目标的影响,因其可表现在 ActRIIa 多肽与活化素之间的结合亲和性的改变上。

[0103] 仅为阐述目的,在示例性筛选测定中,感兴趣的化合物与通常能够结合活化素的分离并纯化的 ActRIIa 多肽接触。然后向化合物与 ActRIIa 多肽的混合物中加入含有 ActRIIa 配体的组合物。对 ActRIIa/活化素复合物的检测和定量提供了用于测定化合物抑制(或促进)ActRIIa 多肽和活化素之间的复合物形成效力的方法。化合物的效力可通过

使用各种浓度的测试化合物所得的数据生成剂量响应曲线进行评估。此外,还可进行对照测定以提供比较基线。例如,在对照测定中,向含有 ActRIIa 多肽的组合物中加入分离并纯化的活化素,并在没有测试化合物的情况下对 ActRIIa/活化素复合物的形成进行定量。应当理解,一般而言,反应物的混合顺序可以变化,并且可以同时混合。此外,可使用细胞提取物和溶解物来代替纯化蛋白,以提供合适的无细胞测定系统。

[0104] ActRIIa 多肽和活化素之间的复合物形成可通过各种技术检测。例如,复合物形成的调节可采用例如可检测标记蛋白(如放射性标记的(例如,³²P、³⁵S、¹⁴C 或 ³H)、荧光标记的(例如, FITC)、或酶标记的 ActRIIa 多肽或活化素),通过免疫测定或通过色谱检测进行定量。

[0105] 在某些实施方案中,荧光偏振测定和荧光共振能量转移(FRET)测定可用于直接或间接测量 ActRIIa 多肽与其结合蛋白之间的相互作用程度。其它合适的检测模式包括,例如基于光波导(PCT 公开 WO 96/26432 和美国专利 5,677,196)、表面等离子体共振(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器(surface force sensors)的那些检测。

[0106] 相互作用陷阱测定(interaction trap assay),也称为“双杂交测定”,也可用于鉴定破坏或加强 ActRIIa 多肽与其结合蛋白之间的相互作用的药剂。参见例如,美国专利 5,283,317;Zervos 等人(1993)Cell 72:223-232;Madura 等人(1993)J Biol Chem 268:12046-12054;Bartel 等人(1993)Biotechniques 14:920-924;以及 Iwabuchi 等人(1993)Oncogene8:1693-1696)。在具体的实施方案中,逆双杂交系统可用于鉴定解离 ActRIIa 多肽与其结合蛋白的相互作用的化合物(例如小分子或肽)。参见例如,Vidal 和 Legrain,(1999)Nucleic Acids Res 27:919-29;Vidal 和 Legrain,(1999)Trends Biotechnol 17:374-81;以及美国专利 5,525,490、5,955,280 和 5,965,368。

[0107] 在某些实施方案中,通过其与本文所述的 ActRIIa 或活化素多肽相互作用的能力来鉴定化合物。化合物与 ActRIIa 或活化素多肽之间的相互作用可以是共价或非共价的。例如,这种相互作用可在蛋白水平下使用体外生物化学方法鉴定,所述生物化学方法包括光交联、放射标记的配体结合、以及亲和色谱(Jakoby WB 等人,1974, Methods in Enzymology 46:1)。在某些情况下,化合物可通过基于机制的测定(例如检测结合于活化素或 ActRIIa 多肽的化合物的测定)进行筛选。这可包括固相或液相结合事件。或者,编码活化素或 ActRIIa 多肽的基因可与报告系统(例如, β -半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白)一起转染进入细胞,并任选地通过高通量筛选对库进行筛选或对库的个别成员进行筛选。可使用其它基于机制的结合测定,例如,检测自由能变化的结合测定。可在目标被固定至孔、珠或芯片或者被固定化抗体捕获或者被毛细管电泳分辨的情况下实施结合测定。结合的化合物通常可采用比色法或荧光或表面等离子体共振来检测。

[0108] 6. 示例性治疗用途

[0109] 在某些实施方案中,本发明提供通过对该个体给予治疗有效量的活化素-ActRIIa 拮抗剂(例如 ActRIIa 多肽)来在有此需要的个体中治疗或预防乳腺癌的方法。这些方法可用于对具有发展乳腺癌的高风险的人(尤其是女性)的治疗性和预防性治疗。由于每一位女性都处于发展乳腺癌的风险中,具有发展乳腺癌的高风险的女性是与普通人群或处于某年龄段的女性人群相比,其风险因素赋予更大发展该病可能性的女性。示例性的风险因素包括年龄、家族史或遗传特性(genetic makeup)、生活方式习惯(例如锻炼和饮食)、暴

露于辐射或其它致癌剂、初次生育年龄、遗传改变、以及绝经期后的体重增加。

[0110] 本文所用的“预防”疾病或病症的治疗系指在统计学样本中，化合物在治疗样本中相对于未治疗对照样本减少疾病或病症的发生，或者相对于未治疗对照样本，延迟疾病或病症的一种或多种症状或特征的发作。例如，预防乳腺癌可指治疗后没有新的病变，或者没有或延迟转移性疾病。

[0111] 术语“治疗乳腺癌”系指相对于未治疗对照或相对于治疗前疾病的严重性，改善疾病的一种或多种症状或特征。该术语并不一定要求接受治疗的患者痊愈或者疾病从患者中完全根除。治疗乳腺癌的药剂可以是减轻疾病的一种或多种症状或特征的严重性的药剂。应注意，肿瘤生长与进展受各种因素影响，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，治疗乳腺癌可涉及减少癌细胞增殖或减少细胞分裂速率。或者或另外地，治疗乳腺癌可涉及减少癌细胞存活、增加凋亡、或者减少转移性乳腺癌（尤其是向骨骼转移的乳腺癌）发生或严重性。因此，在某些实施方案中，治疗乳腺癌可涉及既减少细胞分裂又增加细胞死亡。与机制无关，药剂治疗乳腺癌的有效性可通过可观察的标准(metrics) 确定，例如癌细胞数量比对照少（由于减少增殖、增加凋亡、或两者）、或肿瘤尺寸比对照减小。所以治疗乳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关。预防和治疗都可在医生或其他卫生保健提供者所提供的诊断和给予治疗药剂预期效果的分析中得到阐明。

[0112] 当观察目标拮抗剂对人类乳腺癌进展的影响时，可通过可测量疾病的减少或消失、和/或没有新病变、或防止转移来评估影响。例如，活化素-ActRIIa 拮抗剂可显著地减少或延迟患有非侵袭性和侵袭性乳腺癌的患者的乳腺癌进展。此外，该拮抗剂可在具有该疾病风险因素的健康女性中预防或降低发展乳腺癌的风险。该拮抗剂还可在具有该疾病史的患者中降低乳腺癌复发的风险。

[0113] 因此，活化素-ActRIIa 拮抗剂可用于在被认为处于发展该疾病的风险中的个体中预防或延迟乳腺癌的发作，并且此类拮抗剂可用于选则的患者人群。合适的患者人群的实例包括具有乳腺或卵巢癌家族史的患者，例如其中母亲或姐妹已被诊断患有该疾病的女性患者。还包括 BRCA 1/2 基因或其它被证明使女性易患乳腺或卵巢癌症的基因发生突变的患者。在一种实施方案中，用活化素-ActRIIa 拮抗剂治疗被认为处于发展乳腺癌的高度风险中，但尚未诊断患有该疾病的患者。此类治疗可开始于该患者年龄达到 30、35 或 40 岁时，或者女性患者不试图怀孕（例如该患者不计划养育婴儿）或已达到绝经期时。具体来说，本文呈现的数据显示活化素-ActRIIa 拮抗剂抑制被引入体循环 (general circulation) 的乳腺癌细胞系的转移性扩散，这显示此类拮抗剂可用于预防乳腺肿瘤的转移。此类化合物可用于治疗已诊断患有乳腺癌或怀疑患有乳腺癌的任何患者。此外，因发展乳腺肿瘤的风险升高而考虑进行预防性或选择性乳房切除术的患者可替代选择或另外使用活化素-ActRIIa 拮抗剂来减少未检测的肿瘤转移性扩散的风险。

[0114] 本文公开的活化素-ActRIIa 拮抗剂（尤其是 ActRIIa-Fc 蛋白）可用于治疗或预防患者（包括患有实体肿瘤的患者以及患有转移性癌症的患者）的乳腺癌。活化素-ActRIIa 拮抗剂也可给予具有下列症状的人类对象：乳腺癌前病变或良性病变；或者任何异常增殖性病变，包括典型增生、非典型增生；以及非侵袭性或原位癌。本发明所公开的拮抗剂还可用于治疗或预防激素依赖性或非激素依赖性癌症（例如雌激素受体阳性癌症）

和非激素依赖性癌症（例如雌激素受体阴性或雌激素受体突变癌症）。活化素 -ActRIIa 拮抗剂还用作其中生长因子或癌基因被激活的癌症（例如，其中已表达 c-erbB-2（又称为 HER-2/Neu）酪氨酸激酶的乳腺癌）的治疗剂。活化素 -ActRIIa 拮抗剂可证实在表达升高水平（相对于来源于正常乳腺组织的细胞）的活化素（例如 A、AB 或 B）或者升高水平 ActRIIa 或 ActRIIb 的肿瘤中尤其有用。

[0115] 本发明意识到通过使用目标拮抗剂可增强传统癌症疗法（化疗、放射疗法、光疗法 (phototherapy)、免疫疗法、和手术）的有效性。因此，活化素 -ActRIIa 拮抗剂可用于治疗、预防、或控制乳腺癌的联合疗法中。该拮抗剂可联合放射和 / 或手术治疗，以及细胞毒化疗和 / 或内分泌疗法给予患者。这样的联合治疗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较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种或多种不同疗法的联合疗法有应答。因此，本公开内容涉及同时或按序联合给予活化素 -ActRIIa 拮抗剂与另一种常规抗肿瘤药剂，以便增强该抗肿瘤药剂的疗效或克服对该抗肿瘤药剂的细胞抗性。

[0116] 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、天冬酰胺酶、卡介苗、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林 (buserelin)、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 (dactinomycin)、柔红霉素、己二烯雌酚、己烯雌酚、多西他赛 (docetaxel)、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 (filgrastim)、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺 (flutamide)、吉西他滨、染料木黄酮、戈舍瑞林 (goserelin)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、依立替康、依罗替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙瑞林 (leuprolide)、左旋咪唑、洛莫司汀 (lomustine)、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、美斯纳、甲氨喋呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特 (nilutamide)、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米磷酸盐、喷司他丁、普卡霉素、卟吩姆钠 (porfimer)、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二氯化二茂钛 (titanocene dichloride)、托泊替康、曲妥珠单抗、维 A 酸 (tretinoin)、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0117] 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（巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、喷司他丁和 2-氯脱氧腺苷（克拉屈滨））；抗增殖 / 抗有丝分裂药剂，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 (vincristin)、长春碱 (vinblastin)、诺考达唑、埃坡霉素和诺维本、表二鬼臼毒素 (epidipodophyllotoxins)（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 (cytoxan)、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲三聚氰胺奥沙利铂、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、紫杉醇、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷 (VP16)）；抗生素，例如更生霉素（放线菌素 D actinomycin 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，抑制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）、亚乙基亚胺类和甲基三聚氰胺类（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、链佐星）、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（甲氨喋呤）；铂络合复合物（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）和芳化酶抑制剂（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（例如组织纤溶酶原激活物、链球菌激酶和尿激酶）、阿司匹林、潘生丁、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗；抗转移药；抗分泌药（布雷韦林（breveldin））；免疫抑制剂（环孢霉素、他克莫司（FK-506）、西罗莫司（雷帕霉素）、硫唑嘌呤、麦考酚酸吗乙酯）；抗血管形成化合物（TNP-470、染料木黄酮）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、依立替康）、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胱冬酶激活剂；以及染色质破坏剂。

[0118] 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，例如 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（basement member turnover）抑制剂、血管生成抑制类固醇（angiostaticsteroids）、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。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)，以及美国专利 5,092,885、5,112,946、5,192,744、5,202,352 和 6,573,256。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、内皮抑素蛋白或其衍生物、血管新生抑制素的赖氨酸结合片段、黑色素或促黑色素化合物、纤维蛋白溶酶原片段（例如纤维蛋白溶酶原的 Kringles 1-3）、肌钙蛋白（tropoin）亚基、玻连蛋白 $\alpha v \beta 3$ 的拮抗剂、源自 Saposin 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 α 连接的酸性二肽酶（naaladase）抑制剂。参见，例如，美国专利 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。

[0119] 取决于联合疗法的性质，可在其它疗法正在施用和 / 或之后继续给予本发明的治疗性拮抗剂。本文所述的拮抗剂可以单剂量或多剂量给予。在一些情况下，在传统疗法之前至少数天开始给予拮抗剂，而在另外的情况下，紧邻施用传统疗法之前或施用传统疗

法时开始给予。

[0120] 7. 药物组合物

[0121] 在某些实施方案中,本文所述的活化素 ActRIIa 拮抗剂与药学上可接受的载体一起配制。例如,ActRIIa 多肽可以单独给予或作为药物制剂(治疗组合物)的组分给予。可以配制所述目标拮抗剂(subject antagonists),供以任何方便的方式用于人药或兽药中。

[0122] 在某些实施方案中,本文所述的治疗或预防乳腺癌的方法包括全身给予所述的组合物,或者作为植入物或仪器进行局部给药。给药时,用于本发明的治疗组合物当然是没有热原的生理学上可接受的形式。在本发明的方法中,除也可以任选包含在上述组合物中的活化素-ActRIIa 拮抗剂之外的治疗上有用的药剂也可以与目标拮抗剂同时给予或按序给予。

[0123] 一般地,将肠胃外给予活化素-ActRIIa 拮抗剂。适合肠胃外给药的药物组合物可包含一种或多种 ActRIIa 多肽,以及与之组合的:一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、混悬液或乳液;或者可紧邻使用之前重构成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与有意接受者的血液等渗的溶质、或者悬浮剂或增稠剂。可在本发明药物组合物中采用的合适的水性和非水性载体包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物;植物油,如橄榄油;以及可注射的有机酯,如油酸乙酯。可保持适当的流动性,例如,通过使用包覆材料如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需要的粒度,以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0124] 此外,可以递送到靶组织部位(如乳腺上皮细胞)的形式将组合物包胶囊或注射。在某些实施方案中,本文所述的组合物可包含能够将一种或多种治疗化合物(如 ActRIIa 多肽)递送到靶组织部位(如乳腺上皮细胞)的基质,为发育着的组织提供结构且最好能够被吸收进入体内。例如,所述基质可提供缓慢释放的 ActRIIa 多肽。此类基质可由当前用在其它植入医疗应用中的材料形成。

[0125] 基质材料的选择基于生物相容性、生物可降解性、机械性质、外观和界面性质。目标组合物的具体应用将限定合适的制剂。用于组合物的可能的基质可以是生物可降解的和在化学上定义的硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸和聚酸酐。其它可能的材料是生物可降解的且在生物学上充分定义的,例如骨或真皮胶原。进一步的基质由纯蛋白或细胞外基质组分组成。其它可能的基质是非生物降解且经化学定义的,例如烧结的羟磷灰石、生物玻璃、铝酸盐(aluminates)或其它陶瓷。基质可由任意上述类型的材料的组合构成,例如聚乳酸与羟磷灰石或者胶原蛋白与磷酸三钙的组合。可以在组合物(如钙-铝酸盐-磷酸盐)中改变生物陶瓷,并进行加工,以改变它的孔径、粒度、粒子形状和生物可降解性。

[0126] 在某些实施方案中,本文所述的拮抗剂可口服给药,例如为以下的形式:胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、糖锭(使用矫味基料(flavored basis),通常是蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶)、散剂、颗粒或作为在水或非水液体中的溶液或混悬液、或者作为水包油或油包水的液体乳液、或作为酞剂或糖浆、锭剂(采用惰性基质,如明胶和甘油或者蔗糖和阿拉伯树胶)和/或漱口剂等等,每种形式含有预定量的药剂作为有效成分。拮抗剂也可以以大药丸、药糖剂或糊剂的形式给予。

[0127] 用于口服给药的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣剂、散剂、颗粒等等)中,一种或

多种治疗拮抗剂可与一种或多种药学上可接受的载体（例如柠檬酸钠或磷酸氢钙）和 / 或以下物质中的任意种混合：(1) 填充剂或增量剂，如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸；(2) 粘结剂，如羟甲基纤维素、褐藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和 / 阿拉伯树胶；(3) 保湿剂如甘油；(4) 崩解剂，如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠；(5) 溶液阻滞剂，如石蜡；(6) 吸收促进剂，如季铵化合物；(7) 湿润剂，如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯；(8) 吸收剂，如高岭土和膨润土；(9) 润滑剂，如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物；以及 (10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，药物组合物还可以包含缓冲剂。相似类型的固体组合物也可以在软和硬填充明胶胶囊中用作填充剂，其使用诸如以下的赋形剂：乳糖或奶糖，以及高分子量聚乙二醇等等。

[0128] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、混悬液、糖浆和酞剂。除了活性成分之外，液体剂型可包含本领域通常使用的惰性稀释剂（如水或其它溶剂）、增溶剂和乳化剂（如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇）、油（尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯，及其混合物。除了惰性稀释剂，口服组合物也可以包含佐剂，如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0129] 除了活性化合物，混悬液可包含悬浮剂，如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨醇、失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶，及其混合物。

[0130] 有用于本文所述的方法中的组合物也可以含有佐剂，如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗菌剂和杀真菌剂（例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等）来保证防止微生物的作用。也可希望将等渗剂（如糖、氯化钠等）包含入组合物中。此外，可通过包含延迟吸收的试剂（如单硬脂酸铝和明胶）来延长可注射药物形式的吸收。

[0131] 应该理解，适合于治疗或预防乳腺癌的给药方案将由主治医师考虑各种因素来确定，所述因素改变本发明的目标化合物（如 ActRIIa 多肽）的作用。所述各种因素包括但不限于：患者的年龄、性别、饮食、疾病的严重性、给药时间、以及其它的临床因素。将其它已知的生长因子加入到最终的组合物中也可影响剂量。通过周期性地对各种因素进行评估来对病程进行监测，所述因素包括但不限于：肿瘤的大小、阶段或组织学分级、雌激素或孕酮受体状态、血管浸润以及区域淋巴结转移。临床医师也可以监测诸如以下的标志：蛋白 uPA/PAI1 的水平（高水平的 uPA 和 PAI1 与转移的高风险有关）以及 Her-2 基因扩增和 / 或蛋白表达（其也与转移相关）(Weigelt 等人 2005 Nat. Rev. Cancer 5 :591-602)。可证明基因表达谱也有助于监测疾病的进展 (van 't Veer 等人 2002 Nature 415 :530-536 和 van de Vijver 等人 2002 N. Engl. J. Med. 347 :1999-2009)。

[0132] 在某些实施方案中，本发明还提供治疗或预防乳腺癌的方法，该方法涉及用于在体内产生 ActRIIa 多肽的基因治疗。此类治疗通过将 ActRIIa 多核苷酸序列引入牵涉乳腺癌的细胞或组织（如乳腺上皮细胞）中，而达到其治疗效果。使用重组表达载体（如嵌合病毒或胶体分散系统）可实现递送 ActRIIa 多核苷酸序列。优选地，ActRIIa 多核苷酸序列的治疗性递送使用靶向脂质体。

[0133] 本文所教导的能用于基因治疗的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、痘苗病毒

或 RNA 病毒（如逆转录病毒）。逆转录病毒载体可以是鼠类或禽类逆转录病毒的衍生物。其中可插入单个外源基因的逆转录病毒载体的例子包括但不限于：莫洛尼小鼠白血病毒（MoMuLV）、哈维鼠肉瘤病毒（HaMuSV）、鼠类乳腺肿瘤病毒（MuMTV）和劳氏肉瘤病毒（RSV）。多种其它的逆转录病毒载体可以合并（incorporate）多个基因。所有这些载体可以转移或合并用于可选择标志的基因，以致可识别和产生转导细胞。可通过附加例如糖、糖脂或蛋白质使逆转录病毒载体具有靶向特异性。通过使用抗体来实现优选的靶向性。本领域技术人员将会认识到，可将特异性的多核苷酸序列插入逆转录病毒基因组中或附加到病毒包膜，以允许靶向特异性递送含有 ActRIIa 多核苷酸的逆转录病毒。

[0134] 或者，组织培养细胞可用编码逆转录病毒结构基因 gag、pol 和 env 的质粒通过常规的磷酸钙转染进行直接转染。然后这些细胞用含有感兴趣基因的载体质粒转染。所得的细胞将逆转录病毒载体释放入培养基中。

[0135] 用于 ActRIIa 多核苷酸的另一种靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠粒和脂质基（lipid-based）系统，脂质基系统包括水包油乳液、胶束、混合胶束以及脂质体。本发明优选的胶体系统是脂质体。脂质体是人工膜囊泡，其用作体内和体外的递送工具。RNA、DNA 和完整的病毒粒子可包裹在水性内部，并以生物学活性形式递送到细胞（参见例如 Fraley 等人 Trends Biochem. Sci., 6 :77, 1981）。使用脂质体载体进行有效基因转移的方法在本领域内是公知的，参见例如 Mannino 等人 Biotechniques, 6 :682, 1988。脂质体组合物通常是磷脂的组合，其通常与类固醇，尤其是胆固醇组合。也可使用其它的磷脂或其他的脂类。脂质体的物理特征取决于 pH 值、离子强度和二价阳离子的存在。

[0136] 用于产生脂质体的脂类的例子包括磷脂酰基化合物，如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂以及神经节苷脂。例示性的磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的标靶也可能基于，例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性，这在本领域内是公知的。

实施例

[0137] 以上对本发明进行了概述，参考以下的实施例将更容易理解本发明，所包括的实施例仅仅是阐述本发明的某些方面和实施方案，并不意欲限制本发明。

[0138] 实施例 1 :ActRIIa-Fc 融合蛋白

[0139] 申请人构建了一种具有人 ActRIIa 胞外结构域的可溶性 ActRIIa 融合蛋白，其用最少的接头融合于人或小鼠的 Fc 结构域。所述构建体分别称为 ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc。

[0140] ActRIIa-hFc (SEQ ID NO :7) 如下所示，其纯化自 CHO 细胞系：

[0141] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPYEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0142] ActRIIa-hFc 和 ActRIIa-mFc 蛋白在 CHO 细胞系中表达。考虑三种不同的前导序

10mg/kg 的 ActRIIa-hFc 蛋白,并分别在 24、48、72、144 和 168 小时测量蛋白的血浆浓度。在分开的研究中,大鼠的给予剂量为 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg。在大鼠中,ActRIIa-hFc 的血清半衰期为 11-14 天,两周以后,药物的循环水平相当高(对于开始的给药剂量为 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg,分别为 11 μ g/ml、110 μ g/ml 或 304 μ g/ml)。在猕猴中,血清的半衰期基本上大于 14 天,其在开始的给药剂量为 1mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg 时的药物循环水平分别为 25 μ g/ml、304 μ g/ml 或 1440 μ g/ml。

[0153] 实施例 2:ActRIIa-hFc 蛋白的表征

[0154] 使用组织纤溶酶原前导序列 SEQ ID NO:9,使 ActRIIa-hFc 融合蛋白在稳定转染的 CHO-DUKX B11 细胞中从 pAID4 载体(SV40ori/增强子,CMV 启动子)表达。按以上实施例 1 中所述纯化的蛋白的序列为 SEQ IDNO:7。Fc 部分是如序列 SEQ ID NO:7 中所示的人 IgG1 Fc 序列。唾液酸分析结果表明蛋白中平均含有约 1.5-2.5 摩尔的唾液酸/摩尔 ActRIIa-hFc 融合蛋白。

[0155] 这种纯化的蛋白在所有测试的动物中表现出显著长的血清半衰期,包括病人中的 25-32 天的半衰期(见以下的实施例 3)。与报道的在人 293 细胞中表达的 ActRIIa-hFc 融合蛋白(deI Re 等人 J Biol Chem. 2004. 1217;279(51):53126-35)相比,CHO 细胞表达的物质对活化素 B 配体具有更高的亲和性。此外,使用 tPa 前导序列比使用其它的前导序列提供更大的产量,并且与天然的前导序列表达的 ActRIIa-Fc 不同,使用 tPa 前导序列提供了高纯度的 N-末端序列。使用天然的前导序列产生两种主要的 ActRIIa-Fc,每种都具有不同的 N-末端序列。

[0156] 实施例 3:人类临床试验

[0157] 在随机双盲安慰剂对照研究中,将实施例 2 中所述的蛋白给予病人。该研究的主要目的在于评价蛋白在健康的绝经后的女性中的安全性。将 48 位对象随机分成 6 组,接受单剂量的 ActRIIa-hFc 或安慰剂(5 组活性剂:1 组安慰剂)。静脉给予(IV)的剂量范围为 0.01-3.0mg/kg,皮下给予(SC)的剂量范围为 0.03-0.1mg/kg。给所有的对象给药 120 天。如果在进入研究的 6 个月内,有对象服药后影响骨代谢,那么将其从研究中排除。给每个组作安全性评价以确定剂量的递增量。除了药代动力学(PK)分析之外,还通过测量骨形成和吸收的生物化学标记以及 FSH 水平,评价 ActRIIa-hFc 的生物活性。

[0158] 该研究中没有报道严重的不良事件(adverse events)。不良事件(AEs)一般轻微且短暂。AEs 的初步分析包括头痛、升高的实验室数值、发冷的症状、呕吐、静脉渗透以及注射部位的血肿。

[0159] ActRIIa-hFc 的 PK 分析显示剂量的线性分布,且平均半衰期为约 25-32 天。ActRIIa-hFc 的曲线下面积(AUC)与剂量线性相关,SC 剂量给药之后,吸收基本上完成。这些数据表明 SC 是剂量给药的合意方式,因为它为药物提供相当的生物利用度和血清半衰期,同时避免在 IV 剂量给药的头几天伴有的药物血清浓度峰值。ActRIIa-hFc 导致快速、持续地剂量依赖性增加骨特异性碱性磷酸酶(BAP)的血清水平,BAP 是合成代谢性骨生长的标志,以及导致剂量依赖性降低 C-末端 1 型胶原蛋白端肽和抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 水平,C-末端 1 型胶原蛋白端肽和抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 是骨吸收的标志。其它的标志(例如 P1NP)显示非决定性的结果。BAP 水平在最高药物剂量处显示接近最大的效果,这表明在剂量为 0.3mg/kg 时,增加到高达 3mg/kg 时,可实现对该合成代谢性骨的生物标志的半最大效

应。作为药效效果与药物的 AUC 的关系计算, EC50 为 51465 (天* ng/ml)。在最高的测试剂量水平下, 这些骨的生物标志变化大约持续 120 天。与活化素的抑制一致的血清 FSH 水平也存在剂量依赖性降低。

[0160] 对健康的绝经后女性给予单剂量的 ActRIIa-hFc 是安全的, 且对测试的剂量水平范围有良好的耐受性。延长的 PK 和药效效果表明间断性的剂量给药对未来的研究将是合适的。例如, 基于血清半衰期的剂量给药可以按月进行, 或者按照每 2、3、4、5 或 6 周一次的顺序进行。此外, 由于药效效果延续远超出药物在血清的停留时间, 可基于药效效果进行剂量给药, 意思是每 3 个月或者每 2、3、4、5、6 或甚至 12 个月剂量给药, 也可对病人有效产生所需要的效果。这种临床试验表明 ActRIIa-hFc 在人中是一种骨合成代谢剂 (osteoblastic agent), 其生物学证据是骨形成的增加和骨吸收的减少。

[0161] 实施例 4: ActRIIa-Fc 改善或预防由乳腺癌转移引起的骨质流失

[0162] 据估计 65-75% 的乳腺癌转移到骨, 使得骨结构发生实质性损坏, 增加骨折的风险, 并引起疼痛和其它的副作用。我们在已经转移到骨的乳腺癌的小鼠模型中测试了 ActRIIa-Fc 的效果。

[0163] 将人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的亚系 (克隆 2287, Kang 等人 Cancer Cell 2003, 第 3 卷 :537-549) 在体外培养, 并在密度为 5×10^6 细胞 /ml 时收获细胞。MDA-MB-231 是一种高度有能力种入 (seeding into) 骨并引起骨损害的细胞系, 所述损害与骨转移所导致的损害类似。在研究的第 0 天将 10μ l 细胞注射入 6 周龄的雌性无胸腺裸鼠的胫骨中。在研究的第 10 天, 小鼠接受 ActRIIa-mFc (10mg/kg/ 每周 2 次 / 皮下) (n = 8) 或者 PBS 载体 (n = 7)。采用双能量 X 线吸收测量法 (PIXIMus) 以每周的间隔测试骨矿物质密度的变化, 以评价疾病的进展。小鼠用 ActRIIa-mFc 治疗 4 周, 然后被处死, 收集每只动物的胫骨 (注射肿瘤和未肿瘤化的胫骨两者)。然后对胫骨进行处理并准备用于显微计算机辅助断层造影 (microCT) 和组织学分析。

[0164] 与相对侧的腿部相比, 给无胸腺裸鼠胫骨内注射 MDA-MB-231 细胞促进经注射的胫骨中的骨溶性损害的发展。近端的胫骨的 MicroCT 分析表明, 与用 PBS 载体治疗的小鼠的未肿瘤化的胫骨相比, 带有 MDA-MB-231 的胫骨中的骨松质的量减少 62%。与载体治疗相比, ActRIIa-mFc 治疗导致未处理 (naive) 胫骨或带有肿瘤的胫骨分别增加 70% 或 147% (两个均 $P < 0.01$)。ActRIIa-mFc 治疗的小鼠的带有肿瘤胫骨的骨松质密度与用 VEH 治疗的小鼠的未处理胫骨相似 ($p = 0.39$)。

[0165] 因此, ActRIIa-mFc 能够消除骨中与有乳腺肿瘤细胞的存在相关的骨损害。

[0166] 实施例 5: ActRIIa-Fc 减少乳腺癌转移并促进存活

[0167] 作为转移性疾病的模型, 可以通过心内注射将 MDA-MB-231 细胞引入小鼠中。注射入左心室的细胞将通过血流迁移, 并在远端部位形成转移性病变。衍生的细胞系 MDA-MB-231-luc-D3H2LN (Caliper Life Sciences) 是表达荧光素酶的细胞系, 其允许使用生物光子成像技术 (Caliper Life Sciences) 非侵入性地监测转移性肿瘤的形成。这种模型用于评价 ActRIIa-mFc 对减少转移性乳腺癌病变的形成的潜力。

[0168] 通过心内注射将 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 细胞引入到 26 只无胸腺的裸鼠中。所述裸鼠中的 14 只用载体 (磷酸盐缓冲盐水 -PBS) 治疗, 12 只用 ActRIIa-mFc (10mg/kg, 每周 2 次, 皮下注射) 治疗, 在对肿瘤给药前 2 周开始注射, 并持续整个研究过程。对另外 9

只小鼠模拟注射细胞并用 ActRIIa-mFc 治疗。周期性地麻醉小鼠,并使发射的生物荧光显现,以检测转移进展的形成。

[0169] ActRIIa-mFc 治疗组表明实质性减少转移性损害的发展。到第 5 周,14 只用载体治疗的小鼠中的 12 只表现出指示有转移扩散的多个强烈荧光信号,而 12 只用 ActRIIa-mFc 治疗的小鼠中只有 4 只表现出相似的损害(图 3)。荧光强度的定量表明治疗的小鼠中的荧光信号大约降低 10 倍。

[0170] 此外,ActRIIa-mFc 治疗显著地增加小鼠的存活。到研究的第 40 天,用载体治疗的所有(14/14)小鼠都已经死亡或者安乐死(按照用于人道处理研究动物的标准程序),而用 ActRIIa-mFc 治疗的小鼠中只有 2 只(2/12)死亡或安乐死。到第 45 天,12 只用 ActRIIa-mFc 治疗的小鼠中的 3 只死亡或安乐死,模拟注射的小鼠无一死亡。因此,在这种转移性乳腺癌的模型中,ActRIIa-mFc 治疗导致实质性减少转移性损害的形成,并促进存活。这些数据表明,ActRIIa-Fc 可用于治疗病人的乳腺癌,尤其是与其它疗法结合治疗,所述其它疗法例如为针对原发性肿瘤的手术、激素治疗或者传统的化疗。

[0171] 实施例 6:替代性 ActRIIa-Fc 蛋白

[0172] 公开号为 W02006/012627 的国际专利申请中(参见第 55-60 页)(将其整体纳入本文中作为参考)描述了根据本文所描述的方法可以采用的各种 ActRIIa 变体。替代的构建体可以将 C-末端尾部(ActRIIa 的胞外结构域的最后 15 个氨基酸)删除。以下表示此类构建体的序列(加下划线的部分为 Fc 部分)(SEQ ID NO:12):

[0173] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRT
DCVEKKDSPEVYFCCCEGMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTI SKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0174] 并入作为参考

[0175] 本文所提及的所有出版物和专利都整体地纳入本文中作为参考,犹如每一个单独的出版物或专利具体且单独地纳入本文中作为参考一样。如果出现抵触,以本发明,包括本文中的任何定义为准。

[0176] 虽然讨论了本主题的具体实施方案,但以上的说明书只是作为说明之用,并非作限制。显然,本领域的技术人员在读完本说明书和以下权利要求书之后可作出很多的变化。本发明的完整的范围应当通过参考权利要求书及其等同物的全部范围,以及说明书连同此类变化来确定。

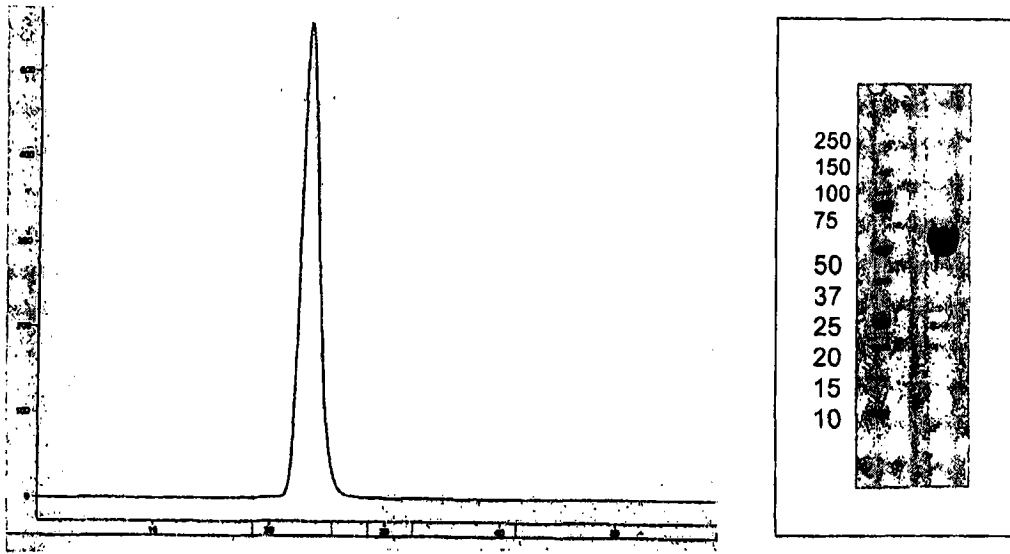


图 1

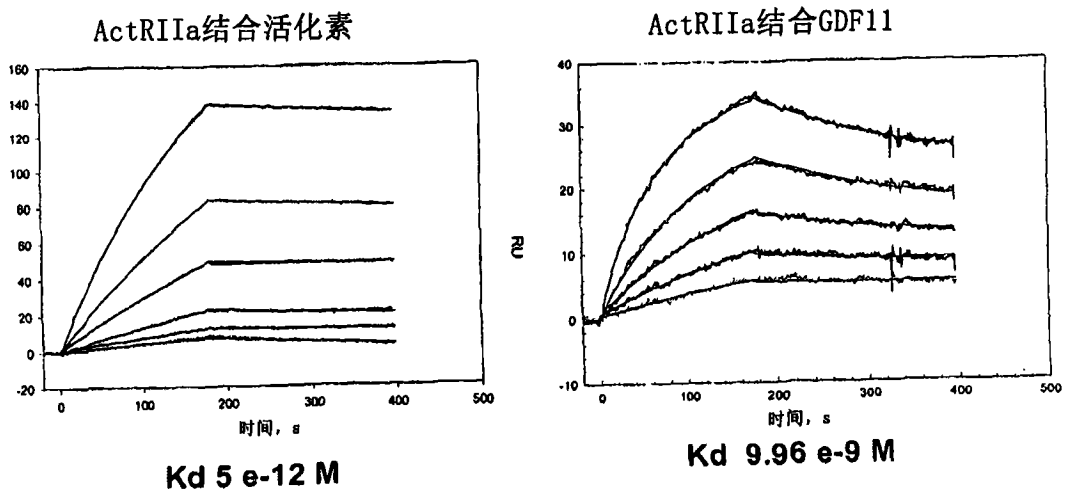
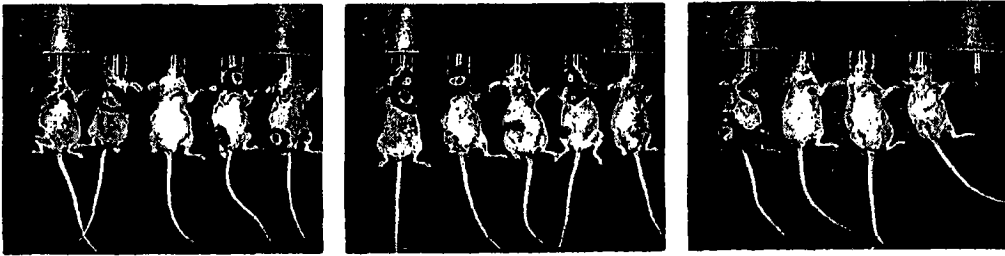


图 2

乳腺癌转移 (MDA-MB-231细胞)

PBS对照 (14只小鼠)



ActRIIa-mFc处理 (12只小鼠)

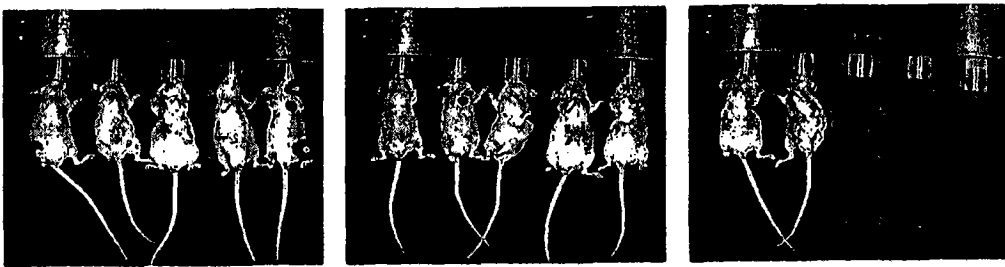


图 3