



(10) 授权公告号 CN 108697793 B

(45) 授权公告日 2023.08.01

(21) 申请号 201680079781.5

(22) 申请日 2016.11.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108697793 A

(43) 申请公布日 2018.10.23

(30) 优先权数据  
62/258934 2015.11.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.07.23

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/063557 2016.11.23

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/091706 EN 2017.06.01

(73) 专利权人 阿塞勒隆制药公司  
地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 M.L.谢尔曼 K.M.阿蒂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

专利代理师 初明明 万雪松

(51) Int.Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 38/18 (2006.01)  
A61P 27/02 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 101687016 A, 2010.03.31  
WO 2015161220 A1, 2015.10.22  
Vassiliki Poulaki等. Activin a in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression.《The American Journal of Pathology》.2004,第164卷(第4期),1293-1302.

审查员 张丽华

权利要求书1页 说明书120页  
序列表55页 附图18页

(54) 发明名称  
治疗眼睛疾病的方法

(57) 摘要  
本文公开了用于提高有需要的患者的视觉敏锐度和用于治疗眼睛血管疾病的组合物和方法。本发明的组合物包含ACTRII拮抗剂。

1. 组合物在制备用于治疗骨髓增生异常综合征患者的眼睛血管疾病的药物中的用途, 其中所述组合物包含有效量的激活素II型受体(ActRII)拮抗剂; 其中所述ActRII拮抗剂由(1)多肽和(2)免疫球蛋白Fc结构域组成, 所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸25-131组成; 其中所述多肽在对应于SEQ ID NO:1的第79位的氨基酸位置包含天冬氨酸(D)或谷氨酸(E); 并且

其中所述多肽能够结合GDF8和/或GDF11。

2. 权利要求1的用途, 其中所述多肽包含一个或多个选自以下的氨基酸修饰: 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、生物素化氨基酸和与脂质部分缀合的氨基酸。

3. 权利要求2的用途, 其中所述多肽被糖基化且具有哺乳动物糖基化模式。

4. 权利要求3的用途, 其中所述多肽被糖基化且具有从中国仓鼠卵巢细胞系可获得的糖基化模式。

5. 权利要求1的用途, 其中所述多肽结合GDF11。

6. 权利要求1的用途, 其中所述多肽结合GDF8。

7. 权利要求1的用途, 其中所述多肽结合激活素B。

8. 权利要求1的用途, 其中所述ActRII拮抗剂还包含位于ActRII结构域和免疫球蛋白Fc结构域之间的接头结构域。

9. 权利要求1的用途, 其中相对于SEQ ID NO:1, 所述多肽在第79位包含D。

10. 权利要求1的用途, 其中所述ActRII拮抗剂与一种或多种另外的活性剂或支持疗法联合施用给有需要的患者, 以供治疗眼睛疾病。

11. 权利要求10的用途, 其中所述一种或多种支持疗法选自: 手术、激光疗法、光凝固、抗-血管生成疗法、Ca<sup>2+</sup>抑制剂、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂、iGluR拮抗剂、抗氧化剂、抗炎药、抗血小板疗法、抗凝疗法、类固醇、不含类固醇的免疫抑制剂和膳食补充剂。

12. 权利要求10的用途, 其中所述一种或多种另外的活性剂选自: VEGF-A抑制剂、胎盘生长因子(PIGF)抑制剂、VEGF和PIGF抑制剂、阿柏西普、雷珠单抗和贝伐单抗。

13. 权利要求1的用途, 其中所述ActRII拮抗剂通过眼睛或玻璃体内给药施用。

14. 组合物在制备用于提高患有眼睛血管疾病的骨髓增生异常综合征患者的视力的药物中的用途, 其中所述组合物包含有效量的激活素II型受体(ActRII)拮抗剂; 其中所述ActRII拮抗剂由(1)多肽和(2)免疫球蛋白Fc结构域组成, 所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸25-131组成; 其中所述多肽在对应于SEQ ID NO:1的第79位的氨基酸位置包含天冬氨酸(D)或谷氨酸(E); 并且其中所述多肽能够结合GDF8和/或GDF11。

15. 权利要求14的用途, 其中向有需要的患者施用所述组合物提高视觉敏锐度。

16. 组合物在制备用于治疗或减轻骨髓增生异常综合征患者的眼睛疾病的严重程度的药物中的用途, 其中所述组合物包含有效量的激活素II型受体(ActRII)拮抗剂; 其中所述ActRII拮抗剂由(1)多肽和(2)免疫球蛋白Fc结构域组成, 所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸25-131组成; 其中所述多肽在对应于SEQ ID NO:1的第79位的氨基酸位置包含天冬氨酸(D)或谷氨酸(E); 并且其中所述多肽能够结合GDF8和/或GDF11。

## 治疗眼睛疾病的方法

[0001] 相关申请的交叉参照

[0002] 本申请要求2015年11月23日提交的美国临时申请号62/258,934的优先权的益处,前一申请的说明书以其全文通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 作为代谢活性最强的组织之一,眼睛的结构和功能的完整性取决于来自血液的正常的氧气供应和营养素[Suk-Yee et al.(2012)Oxidative Medicine and CellularLongevity 2012:1-10]。为了满足这样的高的代谢需求,眼睛包含几个结构和功能不同的血管床,其对维持视力至关重要的眼睛器官供应氧气和营养素[Kiel J.W.(2010)The Ocular Circulation.San Rafael(CA)Morgan&Claypool Life Sciences,第2章,解剖学]。这些包括视网膜和脉络膜血管系统,其分别供应视网膜的内部和外部部分,和位于角膜外周的缘血管组织。损害眼内血管的正常结构和/或功能的损伤和疾病,特别是与缺血和血管并发症有关的那些,例如新血管化、血管渗漏和血管闭塞,是造成视力受损和失明的主要原因之一[Kaur et al.(2008)Clinical Ophthalmology 2(4):879-999]。这样的损伤和疾病常常导致眼内缺氧和/或氧化应激升高(如,活性氧种类的水平增加),这会对视网膜和视神经造成特别损害。因此,在许多缺血性和微血管功能不全症中,视力丧失是由于视网膜损伤、视神经损伤和玻璃体出血(血液和液体溢出或渗漏进入眼睛玻璃体液中中和周围的区域)中的一种或多种造成的。

[0005] 例如,糖尿病性视网膜病变是影响视网膜血管系统的最常见疾病之一,其可在1型糖尿病或2型糖尿病患者中表现出来[Shin et al.(2014)JOphthalmic VisRes.9(3):362-373]。起先,糖尿病性视网膜病变一般是无症状的或只导致轻度视力问题。然而,如果不加以治疗,糖尿病性视网膜病变最终会导致失明。在疾病的早期阶段,归类为非增殖性视网膜病变,在视网膜血管中发生微动脉瘤。随着疾病进展,更多的血管受损或阻塞,导致缺血,这促进新血管生长(新血管化)以试图补偿氧气和营养素循环的减少。这个阶段的疾病被称为增殖性视网膜病变。新血管沿着视网膜和充满眼睛内部的透明玻璃体凝胶表面形成。这些新血管具有容易渗漏液体(全血和/或其一些成分)和破裂的薄而脆的管壁。这样的渗漏导致视网膜各层内和玻璃体液中的血液和/或液体混合集中,造成视力模糊。同样,血液和/或流体会渗入视网膜的斑点,其为眼睛负责锐利、直前视觉的部分。当斑点肿胀时,患者中央视力变得扭曲。这种状况被称为黄斑水肿,并且如果不加以治疗,会在糖尿病患者中导致黄斑变性。

[0006] 缺血和微血管病理学也与许多其它眼睛疾患有关,包括,例如黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、斯塔加特氏病和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎和早产儿视网

膜病变。

[0007] 最有效的治疗眼睛血管疾病的方法是针对改善血管和神经损伤并包括,例如激光光凝固 (photocoagulation) 疗法、低剂量辐射,和手术 (如,除去新生血管膜和玻璃体切割术)。不幸的是,许多这些疗法效果有限或持续时间短。例如,新生血管膜,其起初对激光疗法有反应,却具有高的复发率,并且在激光治疗过程中,还存在因损伤而导致视力丧失的风险。类似地,在接受低剂量辐射疗法的患者中,还存在新血管化的高复发率。手术去除新生血管膜和玻璃体切割术会导致视网膜剥离,并且在治疗后经常与白内障的发展有关 [Benson et al. (1988) Ophthalmic Surgery 19(20):826-824]。最近,多种VEGF拮抗剂已被批准用于年龄相关的黄斑变性并正进行用于其它眼睛适应症的试验。然而,VEGF拮抗剂疗法还与多种不利并发症有关 [Falavarjani et al. (2013) Eye 27:787-794]。

[0008] 因此,对治疗眼睛疾患,特别是与缺血和/或微血管功能不全相关的那些眼睛疾患,存在高度未满足的需要。因此,本公开内容的目的是提供在有需要的患者中提高视力和治疗眼睛血管疾病的方法。

[0009] 发明简述

[0010] 如本文所述的,已发现ActRII拮抗剂(抑制剂)可被用来治疗眼睛(眼部)疾病。特别是,已观察到在患有血管性眼睛损伤相关疾病的患者中,用ActRII多肽治疗可提高视力。因此,在某些方面,本公开内容涉及通过向有需要的患者施用一种或多种ActRII拮抗剂,包括例如ActRII多肽(ActRIIA和ActRIIB多肽以及其变体如GDF诱捕剂(traps)),治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的方法。本文描述的ActRII多肽,以及其变体,结合TGF- $\beta$ 超家族的多种配体[如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。因此,ActRII多肽,特别是可溶性多肽,可被用来抑制ActRII-配体相互作用(如,在细胞膜上存在的天然存在的配体-受体相互作用),因而可被用来抑制ActRII-介导的Smad(如,Smads 1、2、3、5和8)信号传导。因此,虽然不希望受特定的作用机理的束缚,但期望模拟本文描述的ActRII多肽的拮抗特性的其它ActRII抑制剂,或ActRII抑制剂的组合,将具有类似的体内生物效应,包括例如,在患有眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者中提高视力的能力。这样的拮抗性模拟物(如,抑制至少一种ActRII配体和/或ActRII受体的一种或多种变体ActRII多肽,抑制至少一种ActRII配体和/或ActRII受体的一种或多种抗体,抑制至少一种ActRII配体和/或ActRII受体的一种或多种核酸,抑制至少一种ActRII配体和/或ActRII受体的一种或多种小分子,以及其组合)在本文统称为“ActRII拮抗剂”或“ActRII抑制剂”。

[0011] 因此,在某些方面,本公开内容提供用于治疗或预防眼睛疾病(如,眼睛的血管性疾病),特别是治疗或预防所述疾病的一种或多种并发症的方法,其包括施用有效量的ActRII拮抗剂(抑制剂),或ActRII拮抗剂的组合给有需要的受试者(患者)。例如,本公开内容提供在患有眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者中提高视力的方法,其包括施用有效量的ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合。在一些实施方案中,这样的方法提高患者的视力。在其它实施方案中,这样的方法增加患者的视野。在还有的其它实施方案中,这样的方法提高视觉敏锐度和患者的视野。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防眼睛疾病,特别是与缺血有关的眼睛的血管性疾病。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防眼睛疾病,特别是

与微血管功能不全有关的眼睛血管性疾病。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防眼睛疾病,特别是与视网膜病变有关的眼睛血管性疾病。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防眼睛疾病,特别是与视神经病变有关的眼睛血管性疾病。因此,在某些方面,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防一种或多种眼睛疾病,特别是选自以下的眼睛血管性疾病:黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者患有贫血。例如,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者可患有铁粒幼细胞性贫血。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者患有骨髓增生异常综合征。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者患有血红蛋白病。例如,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者可患有地中海贫血病,包括,但不限于 $\beta$ -地中海贫血或中间型地中海贫血。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者没有镰状细胞病。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者没有作为镰状细胞病的并发症的外周视网膜缺血。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者没有作为镰状细胞病的并发症的增殖性镰状视网膜病变。在一些实施方案中,需要治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病的患者没有作为镰状细胞病的并发症的玻璃体出血。类似地,本公开内容提供包含ActRII拮抗剂(抑制剂),或ActRII拮抗剂的组合的组合物和药物,用于治疗或预防如本文描述的眼睛血管性疾病。

[0012] 在某些方面,本公开内容涉及治疗患者的眼睛疾病的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及预防患者的眼睛疾病的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及减轻患者眼睛疾病的严重程度的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,所述眼睛疾病是血管性眼睛疾病。在一些实施方案中,所述眼睛疾病选自:黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病、新生血管性年龄相关的黄斑变性,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、黄斑水肿(如,视网膜静脉闭塞后黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿)糖尿病性视网膜病变(如,糖尿病性视网膜病变和在糖尿病性黄斑水肿患者中的糖尿病性视网膜病变)、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血

或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变。在一些实施方案中,所述方法保持视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于15个字母的与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者视觉敏锐度增加至少15个字母。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法减少视网膜厚度。在一些实施方案中,所述患者先前已用VEGF抑制剂治疗。在一些实施方案中,所述患者对用VEGF抑制剂治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是阿柏西普(aflibercept)。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述患者先前已用哌加他尼治疗。在一些实施方案中,所述患者对用哌加他尼治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者先前已用氟西奈德治疗。在一些实施方案中,所述患者对用氟西奈德治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者没有眼睛或眼睛周围感染。在一些实施方案中,所述患者没有青光眼。在一些实施方案中,所述患者没有活动性眼内炎症。在一些实施方案中,所述患者没有镰状细胞病。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的外周视网膜缺血。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的增殖性镰状视网膜病变。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的玻璃体出血。在一些实施方案中,所述方法还包括联合施用ActRII拮抗剂与一种或多种额外的活性剂或支持性疗法,以供治疗、预防,或减轻眼睛疾病的严重程度。在一些实施方案中,一种或多种支持疗法选自:手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙

芬、依利罗地,和氟吡汀(flupirtine))、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏(desferrioxamine)、甘露醇、别嘌醇(allopurinol)、羟苯磺酸钙(Calcium dobesilate)、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术(cyclodiathermy)、睫状体冷冻疗法(cyclocryotherapy)、眼睛过滤手术(ocular filtering procedures)、引流阀植入、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>)和氟西奈德(Iluvien)),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>)、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是VEGF-A抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是胎盘生长因子(PIGF)抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂抑制VEGF和PIGF。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是阿柏西普。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过胃肠外给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过皮下给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过眼睛给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过玻璃体内给药施用。

[0013] 在某些方面,本公开内容涉及治疗患者的黄斑变性的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及预防患者的黄斑变性的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及减轻患者黄斑变性的严重程度的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,黄斑变性是年龄相关的黄斑变性(AMD)。在一些实施方案中,所述患者具有基于年龄相关的眼睛疾病研究(AREDS)的2级AMD。在一些实施方案中,所述患者具有基于年龄相关的眼睛疾病研究(AREDS)的3级AMD。在一些实施方案中,所述患者具有基于年龄相关的眼睛疾病研究(AREDS)的4级AMD。在一些实施方案中,AMD是新生血管性(湿)AMD。在一些实施方案中,AMD是非-新生血管性(干)AMD。在一些实施方案中,所述方法导致基于AREDS的AMD的至少1级改善(如,基于AREDS从4级至3级的AMD的改善,基于AREDS从3级至2级的AMD的改善,或基于AREDS从2级至1级的AMD的改善)。在一些实施方案中,所述方法导致基于AREDS的AMD的至少2级改善(如,基于AREDS从4级至2级的AMD的改善或基于AREDS从3级至1级的AMD的改善)。在一些实施方案中,所述患者具有至少基于贝克曼黄斑研究分级委员会倡议(BIMRCC)分级的早期AMD。见例如,Frederick L.Ferris III et al. (2013) American Academy of Ophthalmology.120(4):844-851。在一些实施方案中,所述患者患有基于BIMRCC分级的中度AMD。在一些实施方案中,所述患者患有基于BIMRCC分级的晚期AMD。在一些实施方案中,所述方法导致基于(BIMRCC)分级的AMD的至少1级改善(如,基于BIMRCC从晚期至中期AMD的改善或基于BIMRCC从中期至早期AMD的改善)。在一些实施方案中,所述方法导致基于(BIMRCC)分级的AMD的至少2级改善(如,基于BIMRCC从晚期至早期AMD的改善)。在一些实施方案中,所述方法保持视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所

述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者视觉敏锐度增加至少15个字母。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法减少视网膜厚度。在一些实施方案中,所述患者先前已用VEGF抑制剂治疗。在一些实施方案中,所述患者对用VEGF抑制剂治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是阿柏西普。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述患者先前已用哌加他尼治疗。在一些实施方案中,所述患者对用哌加他尼治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者先前已用氟西奈德治疗。在一些实施方案中,所述患者对用氟西奈德治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者没有眼睛感染或眼睛周围感染。在一些实施方案中,所述患者没有青光眼。在一些实施方案中,所述患者没有活动性眼内炎症。在一些实施方案中,所述患者没有镰状细胞病。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的外周视网膜缺血。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的增殖性镰状视网膜病变。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的玻璃体出血。在一些实施方案中,所述方法还包括联合施用ActRII拮抗剂与一种或多种额外的活性剂或支持性疗法,以供治疗、预防,或减轻眼睛疾病的严重程度。在一些实施方案中,一种或多种支持疗法选自:手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌呤、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、眼睛过滤手术、引流阀植入、抗血小板

疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>)和氟西奈德(Iluvien)),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>)、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是VEGF-A抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是胎盘生长因子(PIGF)抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂抑制VEGF和PIGF。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是阿柏西普。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过胃肠外给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过皮下给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过眼睛给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过玻璃体内给药施用。

[0014] 在某些方面,本公开内容涉及治疗患者的黄斑水肿的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及预防患者的黄斑水肿的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及减轻患者黄斑水肿的严重程度的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,所述患者具有视网膜静脉闭塞(RVO)后黄斑水肿。在一些实施方案中,RVO是分支RVO。在一些实施方案中,RVO是中央RVO。在一些实施方案中,所述患者既患有分支RVO,又患有中央RVO。在一些实施方案中,RVO是半-中央RVO。在一些实施方案中,黄斑水肿是糖尿病性黄斑水肿。在一些实施方案中,所述方法保持视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述

患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者视觉敏锐度增加至少15个字母。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法减少视网膜厚度。在一些实施方案中,所述患者先前已用VEGF抑制剂治疗。在一些实施方案中,所述患者对用VEGF抑制剂治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是阿柏西普。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述患者先前已用哌加他尼治疗。在一些实施方案中,所述患者对用哌加他尼治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者先前已用氟西奈德治疗。在一些实施方案中,所述患者对用氟西奈德治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者没有眼睛感染或眼睛周围感染。在一些实施方案中,所述患者没有青光眼。在一些实施方案中,所述患者没有活动性眼内炎症。在一些实施方案中,所述患者没有镰状细胞病。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的外周视网膜缺血。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的增殖性镰状视网膜病变。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的玻璃体出血。在一些实施方案中,所述方法还包括联合施用ActRII拮抗剂与一种或多种额外的活性剂或支持性疗法,以供治疗、预防,或减轻眼睛疾病的严重程度。在一些实施方案中,一种或多种支持疗法选自:手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、眼睛过滤手术、引流阀植入、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>)和氟西奈德(Iluvien)),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>)、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是VEGF-A抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是胎盘生长因子(PIGF)抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂抑制VEGF和PIGF。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是阿柏西普。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过胃肠外给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过皮下给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过眼睛给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过玻璃体内给药施用。

[0015] 在某些方面,本公开内容涉及治疗患者的RVO的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及预防患者的RVO的方法,其包

括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及减轻患者的RVO严重程度的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,RVO是分支RVO。在一些实施方案中,RVO是中央RVO。在一些实施方案中,所述患者既患有分支RVO,又患有中央RVO。在一些实施方案中,所述患者患有半-中央RVO。在一些实施方案中,所述患者具有视网膜静脉闭塞(RVO)后黄斑水肿。在一些实施方案中,所述方法保持视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者视觉敏锐度增加至少15个字母。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法减少视网膜厚度。在一些实施方案中,所述患者先前已用VEGF抑制剂治疗。在一些实施方案中,所述患者对用VEGF抑制剂治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是阿柏西普。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述患者先前已用哌加他尼治疗。在一些实施方案中,所述患者对用哌加他尼治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者先前已用氟西奈德治疗。在一些实施方案中,所述患者对用氟西奈德治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者没有眼睛感染或眼睛周围感染。在一些实施方案中,所述患者没有青光眼。在一些实施方案中,所述患者没有活动性眼内炎症。在一些实施方案中,所述患者没有镰状细胞病。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的外周视网膜缺血。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的增殖性镰状视网膜病变。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的玻璃体出血。在一些实施方案中,所述方法还包括联合施用ActRII拮抗剂与一种或多种额外的活性剂或支持性疗法,以供治疗、预防,或减轻眼睛

疾病的严重程度。在一些实施方案中,一种或多种支持疗法选自:手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、眼睛过滤手术、引流阀植入、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>)和氟西奈德(Iluvien)),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>)、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是VEGF-A抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是胎盘生长因子(PIGF)抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂抑制VEGF和PIGF。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是阿柏西普。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过胃肠外给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过皮下给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过眼睛给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过玻璃体内给药施用。

[0016] 在某些方面,本公开内容涉及治疗患者的视网膜病变的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及预防患者的视网膜病变的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,本公开内容涉及减轻患者视网膜病变的严重程度的方法,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,视网膜病变是糖尿病性视网膜病变。在一些实施方案中,所述患者患有糖尿病性黄斑水肿。在一些实施方案中,基于早期治疗糖尿病性视网膜病变研究(ETDRS)分级,所述患者具有至少轻度非-增殖性糖尿病性视网膜病变(NPDR)。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的中度NPDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的重度NPDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的非常严重的NPDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的早期增殖性糖尿病性视网膜病变(PDR)。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的高风险PDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的晚期PDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS分级的临床意义的黄斑变性的晚期PDR。在一些实施方案中,所述方法导致基于ETDRS分级的糖尿病性视网膜病变的至少1级改善(如,从具有临床意义的黄斑变性的晚期PDR至无显著黄斑变性的晚期PDR的改善,从晚期PDR至高风险PDR的改善,从高风险PDR至早期PDR的改善,从早期PDR至非常严重NPDR的改善,从非常严重NPDR至重度NPDR的改善,从重度NPDR至中度NPDR的改善,或从中度NPDR至轻度NPDR)的改善。在一些实施方案中,所述方法导致糖尿病性视网膜病变基于ETDRS分级的至少2级改善(如,从具有临床意义的黄斑变性晚期PDR至高风险PDR的改善,从晚期PDR至早期PDR的改善,从高风险PDR至非常严重NPDR的

改善,从早期PDR至重度NPDR的改善,从非常严重NPDR至中度NPDR的改善,从重度NPDR至轻度NPDR的改善,或从中度NPDR至无明显的视网膜病变的改善)。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS糖尿病性视网膜病变严重程度量表(ETDRS-DRSS)分级的至少轻度NPDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS-DRSS分级的中度NPDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS-DRSS分级的重度NPDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS-DRSS分级的PDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS-DRSS分级的缺乏糖尿病性黄斑水肿的PDR。在一些实施方案中,所述患者具有基于ETDRS-DRSS分级的存在糖尿病性黄斑水肿的PDR。在一些实施方案中,所述方法导致基于ETDRS-DRSS分级的糖尿病性视网膜病变的至少1级改善(如,改善从存在糖尿病性黄斑水肿的PDR至缺乏糖尿病性黄斑水肿的PDR的改善,从缺乏糖尿病性黄斑水肿的PDR至PDR的改善,从PDR至重度NPDR的改善,从重度NPDR至中度NPDR的改善,从中度NPDR至轻度NPDR的改善,或从轻度NPDR至无明显的视网膜病变的改善)。在一些实施方案中,所述方法导致基于ETDRS-DRSS分级的糖尿病性视网膜病变的至少2级改善(如,从具有糖尿病性黄斑水肿存在的PDR改善至PDR,从不具有糖尿病性黄斑水肿的PDR改善至重度NPDR,从PDR改善至中度NPDR,从重度NPDR至改善轻度NPDR,从中度NPDR改善至不明显,或从轻度NPDR改善至不明显视网膜病变)。在一些实施方案中,所述方法保持视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法保持与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者丧失少于15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少30、45、60、90、100、120、140、160、180、200、250、300或360或更多天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少160天。在一些实施方案中,所述方法提高与基线相比的视觉敏锐度至少360天。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少50、40、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中所述患者视觉敏锐度增加至少15个字母。在一些实施方案中,所述方法提高视觉敏锐度,其中与基线(患者在治疗开始前的视觉敏锐度)相比,所述患者增加至少15个字母的视觉敏锐度。在一些实施方案中,所述方法减少视网膜厚度。在一些实施方案中,所述患者先前已用VEGF抑制剂治疗。在一些实施方案中,所述患者对用VEGF抑制剂治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是阿柏西普。在一些

实施方案中,VEGF抑制剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述患者先前已用哌加他尼治疗。在一些实施方案中,所述患者对用哌加他尼治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者先前已用氟西奈德治疗。在一些实施方案中,所述患者对用氟西奈德治疗是顽固的或不耐受的。在一些实施方案中,所述患者没有眼睛或眼睛周围感染。在一些实施方案中,所述患者没有青光眼。在一些实施方案中,所述患者没有活动性眼内炎症。在一些实施方案中,所述患者没有镰状细胞病。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的外周视网膜缺血。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的增殖性镰状视网膜病变。在一些实施方案中,所述患者没有作为镰状细胞病的并发症的玻璃体出血。在一些实施方案中,所述方法还包括联合施用ActRII拮抗剂与一种或多种额外的活性剂或支持性疗法,以供治疗、预防,或减轻眼睛疾病的严重程度。在一些实施方案中,一种或多种支持疗法选自:手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、眼睛过滤手术、引流阀植入、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>)和氟西奈德(Iluvien)),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>)、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,VEGF抑制剂是VEGF-A抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是胎盘生长因子(PIGF)抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂抑制VEGF和PIGF。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是阿柏西普。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是雷珠单抗。在一些实施方案中,一种或多种额外的活性剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过胃肠外给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过皮下给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过眼睛给药施用。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂通过玻璃体内给药施用。

[0017] 本公开内容的ActRII拮抗剂包括,例如,可抑制ActRII受体(如,ActRIIA和/或ActRIIB受体)信号转导途径(如,通过细胞内介质例如Smads 1、2、3、5和/或8激活信号转导)的药物;可从例如结合和/或激活ActRII受体抑制一种或多种ActRII配体[如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]的药物;抑制ActRII配体和/或ActRII受体表达(如,转录、翻译、细胞分泌,或其组合)的药物;并可抑制ActRII信号传导途径的一种或多种细胞内介质(如,Smads 1、2、3、5和/或8)的药物。这样的药物包括,例如,ActRII(ActRIIA或ActRIIB)多肽,或ActRII多肽及其变体(如,GDF诱捕多肽)的组合;结合于一种或多种ActRII配体和/或ActRII受体的抗体,或抗体的组合;抑制一种或多种ActRII配体和/或ActRII受体的表达的RNA,或RNAs的组合;抑

制一种或多种ActRII配体和/或ActRII受体的表达的小分子,或小分子的组合,以及其组合。

[0018] 在某些方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合,是抑制至少GDF11-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药物。对配体-介导的信号转导的效果可例如使用基于细胞的分析包括,例如本文描述的那些来测定。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少GDF11。配体结合活性可例如使用结合亲和力分析包括,例如,本文描述的那些来测定。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少GDF11。

[0019] 在其它方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合,是抑制至少GDF8-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药物。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少GDF8。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少GDF8。

[0020] 在还有的其它方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选的ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合,是抑制至少激活素-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药物。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少激活素B。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )和/或抑制激活素A活性。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,结合于至少激活素B(如,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合,但基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$   $K_D$ 的结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )和/或抑制激活素A活性。

[0021] 在甚至其它方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合,是抑制至少BMP6-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药剂。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少BMP6。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少BMP6。或者,在其它方面,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP6(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP6或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )和/或抑制BMP6活性。

[0022] 在甚至其它方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合是抑制至少GDF3-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药物。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少GDF3。在一些实施方案中,本公开

内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少GDF3。或者,在其它方面,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于GDF3(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于GDF3或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )和/或抑制GDF3活性。

[0023] 在甚至其它方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合是抑制至少BMP9-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药物。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少BMP9。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少BMP9。或者,在其它方面,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )和/或抑制BMP9活性。

[0024] 在甚至其它方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合是抑制至少BMP10-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药物。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少BMP10。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少BMP10。或者,在其它方面,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )和/或抑制BMP10活性。

[0025] 在进一步的方面,根据本文描述的方法和用途要使用的优选ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合是抑制至少GDF11-和GDF8-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的药剂。因此,本公开内容的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可结合于至少GDF11和GDF8。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII抑制剂以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少GDF11和以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于GDF8。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A、BMP9或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A、BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。

[0026] 在其它进一步的方面,抑制GDF11-和/或GDF8-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号

转导)的拮抗剂,或拮抗剂的组合还可抑制激活素-介导的信号转导。因此,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可结合于至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合于至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可结合于至少激活素B(如,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可结合于至少激活素B(如,以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 结合,但基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A,BMP9,或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A、BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。

[0027] 在其它进一步的方面,抑制GDF11-、GDF8-和/或激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的拮抗剂,或拮抗剂的组合还可抑制BMP6-介导的信号转导。因此,本公开内容的结合于GDF11、GDF8和/或激活素的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,可进一步结合于至少BMP6。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8和/或激活素的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合可以至少 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (如,至少 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,至少 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,或至少 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ )的 $K_D$ 进一步结合于至少BMP6。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合于BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ )。在一些实施方案

中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A、BMP9或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A、BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。

[0028] 在更进一步的方面,抑制GDF11-、GDF8-、激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)和/或BMP6-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的拮抗剂,或拮抗剂的组合还可抑制GDF3-介导的信号转导。因此,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可结合于至少GDF3。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可以至少 $1 \times 10^{-7}$ M(如,至少 $1 \times 10^{-8}$ M,至少 $1 \times 10^{-9}$ M,至少 $1 \times 10^{-10}$ M,至少 $1 \times 10^{-11}$ M,或至少 $1 \times 10^{-12}$ M)的 $K_D$ 结合于至少GDF3。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B和/或BMP6的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A、BMP9或BMP10(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A、BMP9和BMP10或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。

[0029] 在甚至进一步的方面,抑制GDF11-、GDF8-、激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)、BMP6和/或GDF3-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)还可抑制BMP10-介导的信号转导。因此,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可结合于至少BMP10。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可以至少 $1 \times 10^{-7}$ M(如,至少 $1 \times 10^{-8}$ M,至少 $1 \times 10^{-9}$ M,至少 $1 \times 10^{-10}$ M,至少 $1 \times 10^{-11}$ M,或至少 $1 \times 10^{-12}$ M)的 $K_D$ 结合于至少BMP10。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B、BMP6、GDF3和/或BMP10的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B、BMP6、GDF3和/或BMP10的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素B、BMP6、GDF3和/或BMP10的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。

的组合,基本上不结合于激活素A或BMP9(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A和BMP9或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。

[0030] 在其它方面,抑制GDF11-、GDF8-、激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)、BMP6、GDF3和/或BMP10-介导的信号转导(如,Smad 2/3信号转导)的拮抗剂,或拮抗剂的组合还可抑制BMP9-介导的信号转导。因此,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3和/或BMP10的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,还可结合于至少BMP9。在一些实施方案中,本公开内容的结合GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3和/或BMP10的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合还可以至少 $1 \times 10^{-7}$ M(如,至少 $1 \times 10^{-8}$ M,至少 $1 \times 10^{-9}$ M,至少 $1 \times 10^{-10}$ M,至少 $1 \times 10^{-11}$ M,或至少 $1 \times 10^{-12}$ M)的 $K_D$ 结合于至少BMP9。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9的ActRII抑制剂,或抑制剂的组合,基本上不结合于激活素A(如,以高于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。

[0031] 在某些方面,本公开内容涉及治疗或预防眼睛的血管性疾病的方法和组合物,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRII多肽。术语“ActRII多肽”统称为天然存在的ActRIIA和ActRIIB多肽及其截短和如本文描述的那些变体(如,GDF诱捕多肽)。优选地,ActRII多肽包含,基本上由,或由ActRII多肽或其修饰(变体)形式的配体-结合结构域组成。例如,在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含,基本上由,或由ActRIIA多肽的ActRIIA配体-结合结构域,例如ActRIIA细胞外结构域的部分组成。类似地,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由ActRIIB多肽的ActRIIB配体-结合结构域,例如ActRIIB细胞外结构域的部分组成。优选地,根据本文描述的方法和用途要使用的ActRII多肽是可溶性多肽。

[0032] 在某些方面,本公开内容涉及用于治疗或预防眼睛的血管性疾病的方法和组合物,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRIIA多肽。例如,在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIA多肽包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:9的氨基酸序列30-110至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIA多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIA多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在甚至其它实施方案中,ActRIIA多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在还有的其它实施方案中,ActRIIA多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:32的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在甚至其它实施方案中,ActRIIA多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在甚至其它实施方案中,ActRIIA多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。

[0033] 在其它方面,本公开内容涉及用于治疗或预防眼睛的血管性疾病的方法和组合物,其包括施用于有需要的患者有效量的ActRIIB多肽。例如,在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列29-109至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列29-109至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸[天然存在的(E或D)或人工的酸性氨基酸]。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列25-131至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列25-131至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在还有的其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:4,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、



在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:61的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:61的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:65的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:65的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:41的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:41的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在甚至其它实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽可包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成,其中相对于SEQ ID NO:1,ActRIIB多肽在第79位包含酸性氨基酸。在某些实施方案中,根据本文描述的方法和用途要

使用的ActRIIB多肽不包含对应于SEQ ID NO:1的L79位置的酸性氨基酸。

[0034] 在其它方面,本公开内容涉及用于治疗或预防眼睛的血管性疾病的方法和组合物,其包括施用于有需要的患者有效量的GDF诱捕多肽(GDF诱捕剂)。在一些实施方案中,GDF诱捕剂包含,基本上由,或由改变的ActRII配体-结合结构域组成,所述配体-结合结构域具有的对激活素A结合的 $K_d$ 与对GDF11和/或GDF8结合的 $K_d$ 的比率为相对于野生型配体-结合结构域的比率的至少2<sup>-</sup>、5<sup>-</sup>、10<sup>-</sup>、20<sup>-</sup>、50<sup>-</sup>、100<sup>-</sup>,或甚至1000<sup>-</sup>倍。任选地,包含改变的配体-结合结构域的GDF诱捕剂具有为相对于野生型ActRII配体-结合结构域的对抑制激活素A的 $IC_{50}$ 与对抑制GDF11和/或GDF8的 $IC_{50}$ 的比率的至少2<sup>-</sup>、5<sup>-</sup>、10<sup>-</sup>、20<sup>-</sup>、25<sup>-</sup>、50<sup>-</sup>、100<sup>-</sup>,或甚至1000<sup>-</sup>倍。任选地,包含改变的配体-结合结构域的GDF诱捕剂以比抑制激活素A的 $IC_{50}$ 更低的 $IC_{50}$ 抑制GDF11和/或GDF8(后者为前者的至多1/2、1/5、1/10、1/20、1/50,或甚至1/100)。这些GDF诱捕剂可以是包括免疫球蛋白Fc结构域(或者野生型或者突变体)的融合蛋白。在某些情况下,本发明的可溶性GDF诱捕剂是GDF8和/或GDF11-介导的细胞内信号传导(如,Smad 2/3信号传导)的拮抗剂(抑制剂)。

[0035] 在一些实施方案中,本公开内容提供为包含改变的配体-结合(如,GDF11-结合)域的可溶性ActRIIB多肽的GDF诱捕剂。具有改变的配体-结合结构域的GDF诱捕剂可包含,例如人ActRIIB的氨基酸残基如E37、E39、R40、K55、R56、Y60、A64、K74、W78、L79、D80、F82和F101(相对于SEQ ID NO:1编号)的一种或多种突变。任选地,改变的配体-结合结构域可增加对于配体如GDF8/GDF11相对于ActRIIB受体的野生型配体-结合结构域的选择性。为了说明,这些突变在此显示增加改变的配体-结合结构域对于GDF11(并且因此,推测对于GDF8)超过以下激活素的选择性:K74Y、K74F、K74I、L79D、L79E和D80I。以下突变具有相反的效应,增加激活素结合超过GDF11的比率:D54A、K55A、L79A和F82A。通过包纳“尾”区或假设地,非结构化连接区,并且还通过使用K74A突变,可增加总(GDF11和激活素)结合活性。引起配体结合亲和力的全面降低的其它突变包括:R40A、E37A、R56A、W78A、D80K、D80R、D80A、D80G、D80F、D80M和D80N。突变可以结合以达到预期效果。例如,影响GDF11:激活素结合比率的许多突变对配体结合具有总的负面影响,因此,这些可与一般增加配体结合以产生具有配体选择性的改进的结合蛋白的突变体结合。在一个示例性实施方案中,GDF诱捕剂是包含L79D或L79E突变的ActRIIB多肽,任选地与额外的氨基酸取代、添加,或缺失组合。

[0036] 如本文所述的,ActRII多肽和其变体(GDF诱捕剂)可是同聚物,例如,同型二聚体、同型三聚体、同型四聚体、同型五聚体,和高阶同聚物配合物。在某些优选的实施方案中,ActRII多肽及其变体是同型二聚体。在某些实施方案中,本文描述的ActRII多肽二聚体包含与第二ActRII多肽共价,或非-共价缀合的第一ActRII多肽,其中第一多肽包含相互作用对(如,免疫球蛋白的恒定域)的第一成员(或第二成员)的ActRII域和氨基酸序列,而第二多肽包含相互作用对的第二成员(或第一成员)的ActRII多肽和氨基酸序列。

[0037] 在某些方面,ActRII多肽,包括其变体(如,GDF诱捕剂),可以是融合蛋白。例如,在一些实施方案中,ActRII多肽可以是融合蛋白包含ActRII多肽域和一或多个异源(非-ActRII)多肽域。在一些实施方案中,ActRII多肽可以是一种融合蛋白,其具有,作为一个域,源自ActRII多肽的氨基酸序列(如,ActRII受体或其变体的配体-结合结构域)和提供所需特性,例如改进的药代动力学、更简单的净化,靶向特定组织等的一或多个异源域。例如,融合蛋白的域可提高体内稳定性、体内半衰期、吸收/施用、组织定位或分布、蛋白配合物的

形成、融合蛋白的多聚化,和/或纯化的一种或多种。任选地,融合蛋白的ActRII多肽域直接连接(融合)到一种或多种异源性多肽域,或间插序列,例如接头,可定位于ActRII多肽的氨基酸序列和一种或多种异源性域氨基酸序列之间。在某些实施方案中,ActRII融合蛋白包含在异源性域和ActRII域之间的相对非结构化连接定位。这种非结构化连接可对应于在ActRIIA或ActRIIB的细胞外结构域C-末端(“尾”)的大致15个氨基酸的非结构化区,或它可以是3和15、20、30、50或更多个氨基酸之间的人工序列,其相对没有次级结构。接头可能富含甘氨酸和脯氨酸残基,并且可能例如,含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列。接头的实例包括,但不限于,序列TGGG (SEQ ID NO:23)、SGGG (SEQ ID NO:24)、TGGGG (SEQ ID NO:21)、SGGGG (SEQ ID NO:22)、GGGG (SEQ ID NO:25)、GGGG (SEQ ID NO:20)和GGG (SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,ActRII融合蛋白可包含免疫球蛋白的恒定域,包括,例如免疫球蛋白的Fc部分。例如,源自IgG (IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA (IgA1或IgA2)、IgE,或IgM免疫球蛋白的Fc结构域。例如,免疫球蛋白域的am Fc部分可包含,基本上由,或由与SEQ ID NOs:14-18的任何一个有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。这样的免疫球蛋白域可包含一种或多种氨基酸修饰(如,缺失、添加和/或取代),其赋予改变的Fc活性,例如,降低一种或多种Fc效应子功能。在一些实施方案中,ActRII融合蛋白包含式A-B-C中规定的氨基酸序列。例如,B部分是如本文描述的N-和C-末端截短的ActRII多肽。A和C部分可独立地为0、一,或多于一个氨基酸,而A和C两个部分是与B异源的。A和/或C部分可经由连接序列连接于B部分。在某些实施方案中,ActRII融合蛋白包含前导序列。前导序列可以是天然ActRII前导序列(如,天然ActRIIA或ActRIIB前导序列)或异源性前导序列。在某些实施方案中,前导序列是组织纤溶酶原激活剂(TPA)前导序列。

[0038] ActRII多肽,包括其变体(如,GDF诱捕剂),可包含纯化子序列,例如表位标记、FLAG标记、聚组氨酸序列,和GST融合。任选地,ActRII多肽包含一种或多种选自以下的修饰的氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸,和缀合于有机衍生试剂的氨基酸。ActRII多肽可包含至少一种N-键结的糖,并可包括2、3或更多个N-键结的糖。这样的多肽也可包含O-键结的糖。一般来说,优选ActRII拮抗剂多肽在适当介导多肽的天然糖基化作用的哺乳动物细胞系中表达,以便降低患者的不利免疫反应的可能性。ActRII多肽可以适合于患者使用的方式在使蛋白糖基化的多种细胞系中生产,包括工程改造的昆虫或酵母细胞,和哺乳动物细胞如COS细胞、CHO细胞、HEK细胞和NS0细胞。在一些实施方案中,ActRII多肽被糖基化且具有从中国仓鼠卵巢细胞系可获得的糖基化模式。在一些实施方案中,本公开内容的ActRII多肽显示在哺乳动物(如,小鼠或人类)中的至少4、6、12、24、36、48,或72小时的血清半衰期。任选地,ActRII多肽可显示在哺乳动物(如,小鼠或人类)中的至少6、8、10、12、14、20、25,或30天的血清半衰期。

[0039] 在某些方面,本公开内容提供包含一种或多种本公开内容的ActRII拮抗剂和药理学上可接受的载体的药物制剂。药物制剂还可包含一种或多种额外的活性剂,例如用来治疗眼睛的血管性疾病例如本文描述的那些的化合物。优选地,本公开内容的药物制剂是基本上无热原的。在某些实施方案中,本公开内容提供包含本文描述的药物制剂的包装药物并被标记用于治疗或预防一种或多种不断增加的眼睛血管性疾病中的一或多种[如,年龄相

关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)]。

[0040] 在某些方面,本公开内容涉及治疗或预防患者的眼睛血管疾病,包括施用于有需要的患者至少一种ActRII拮抗剂和至少一种用于治疗疾病的额外的疗法,包括,例如,手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、眼睛过滤手术、引流阀植入、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>))、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术。

[0041] 在某些方面,本公开内容涉及拮抗ActRII活性(如,抑制ActRIIA和/或ActRIIB信号转导,例如,Smad 1,2,3,5和8信号传导)的抗体,或抗体的组合。特别是,本公开内容提供用于治疗或预防眼睛的血管性疾病的方法,其包括施用有效量的抗体ActRII拮抗剂,或抗体ActRII拮抗剂的组合(如,ActRII配体-结合抗体、ActRII抗体等等)给有需要的个体。例如,在某些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是结合于至少GDF11的抗体,或抗体的组合。在其它实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是结合于至少GDF8抗体,或抗体的组合。在其它实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是结合于至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)的抗体,或抗体的组合。在进一步的实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是结合于至少激活素A和激活素B的抗体,或抗体的组合。在进一步的实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是结合于至少激活素A、激活素B、激活素AB的抗体,或抗体的组合。在还有的其它实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是结合于至少GDF11和GDF8(特别是在多特异性抗体如双特异性抗体的情况下)的抗体,或抗体的组合。任选地,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的抗体,或抗体的组合还结合于激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)、BMP6,或BMP10的一种或多种。在一些实施方案中,本公开内容的结合于GDF11和/或GDF8的抗体,或抗体的组合还结合于至少激活素B。在一些实施方案中,本公开内容的抗体,或抗体的组合结合于,或基本上不结合于激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的K<sub>D</sub>结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。在一些实施方案中,本公开内容的抗体,或抗体的组合不结合于,或基本上不结合于BMP10(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的K<sub>D</sub>结合于BMP10或

具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 。

[0042] 在某些情况下,当施用本公开内容的ActRII拮抗剂,或拮抗剂的组合以治疗或预防眼睛的血管性疾病时,在施用ActRII拮抗剂期间监测对红细胞的影响,或测定或调节ActRII拮抗剂的剂量,以减少对红细胞的不良影响可能是可取的。例如,红细胞水平、血红蛋白水平,或红细胞比容水平的增加可能导致不需要的血压升高。

[0043] 附图简述

[0044] 本专利或专利申请文件包括至少一张彩色绘图。这个带有彩图的专利或专利申请的副本将根据要求并支付必要的费用后由专利局(Office)提供。

[0045] 图1显示了具有本文基于多个ActRIIB和ActRIIA晶体结构的复合分析所推断的直接接触用盒子标明的配体的残基的人ActRIIA (SEQ ID NO:51) 和人ActRIIB (SEQ ID NO:2) 的细胞外结构域的比对。

[0046] 图2显示了多种脊椎动物ActRIIB蛋白和人ActRIIA (SEQ ID NOs:52-58) 的多序列比对以及从比对衍生的共有ActRII序列 (SEQ ID NO:59)。

[0047] 图3显示了在CHO细胞中表达的ActRIIA-hFc的纯化。蛋白作为单一的定义明确的峰纯化,如通过对柱按大小排列(上部小图)和考马斯染色的SDS-PAGE(底部小图)(左道:分子量标准;右道:ActRIIA-hFc)可见的。

[0048] 图4显示了ActRIIA-hFc与激活素(上部小图)和GDF-11(底部小图)的结合,如通过Biacore™分析测量的。

[0049] 图5显示了GDF诱捕剂ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO:46)的全氨基酸序列,包括TPA前导序列(双下划线)、ActRIIB细胞外结构域(在SEQ ID NO:1中的残基20-134;单下划线),和hFc结构域。在天然序列中第79位取代的天冬氨酸是双下划线加突出显示的,正如通过测序发现的在成熟的融合蛋白中是N-末端残基的甘氨酸。

[0050] 图6A和6B显示了编码ActRIIB(L79D 20-134)-hFc的核苷酸序列。SEQ ID NO:47对应于有义链,和SEQ ID NO:60对应于反义链。TPA前导(核苷酸1-66)是加双下划线的,和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-420)是加单下划线的。

[0051] 图7显示了截短的GDF诱捕剂ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO:61)的全氨基酸序列,包括TPA前导(双下划线)、截短的ActRIIB细胞外结构域(在SEQ ID NO:1中的残基25-131;单下划线),和hFc结构域。在天然序列中第79位取代的天冬氨酸是双下划线加突出显示的,正如通过测序发现的在成熟的融合蛋白中是N-末端残基的谷氨酸。

[0052] 图8A和8B显示了编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的核苷酸序列。SEQ ID NO:62对应于有义链,和SEQ ID NO:63对应于反义链。TPA前导(核苷酸1-66)是加双下划线的,和截短的ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-396)是加单下划线的。ActRIIB细胞外结构域的氨基酸序列(在SEQ ID NO:1中的残基25-131)也被显示。

[0053] 图9显示了无前导的截短GDF诱捕剂ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的氨基酸序列 (SEQ ID NO:64)。截短的ActRIIB细胞外结构域(在SEQ ID NO:1中的残基25-131)是加下划线的。在天然序列中第79位取代的天冬氨酸是双下划线加突出显示的,正如通过测序发现的在成熟的融合蛋白中是N-末端残基的谷氨酸。

[0054] 图10显示了无前导、hFc结构域和接头的截短的GDF诱捕剂ActRIIB(L79D 25-131)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:65)。在天然序列中第79位取代的天冬氨酸是下划线加突出显示

的,正如通过测序发现的在成熟的融合蛋白中是N-末端残基的谷氨酸。

[0055] 图11A和11B显示了编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的替代核苷酸序列。SEQ ID NO:66对应于有义链,和SEQ ID NO:67对应于反义链。TPA前导(核苷酸1-66)是加双下划线的,截短的ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-396)是加下划线的,和细胞外结构域的野生型核苷酸序列的取代是双下划线加突出显示的(与SEQ ID NO:62比较,图8)。ActRIIB细胞外结构域的氨基酸序列(在SEQ ID NO:1中的残基25-131)也被显示。

[0056] 图12显示了在图11中所示的替代核苷酸序列(SEQ ID NO:66)的核苷酸76-396(SEQ ID NO:68)。在图11中指明的相同核苷酸取代也在此用下划线加突出显示。SEQ ID NO:68仅编码具有L79D取代的截短的ActRIIB细胞外结构域(对应于在SEQ ID NO:1中的残基25-131),例如,ActRIIB(L79D 25-131)。

[0057] 图13显示GDF诱捕剂可在小鼠MDS模型中的疾病严重程度的多个阶段减轻无效的红细胞生成和改善贫血。(A)在用媒介(Tris-缓冲盐水,TBS,n=5)处理的野生型(Wt)小鼠,用TBS(n=5)处理的MDS小鼠,和用ActRIIB(L79D 25-131)-mFc(10mg/kg,n=6)治疗的MDS小鼠(每周两次,持续8周,在大约6月龄结束(早期阶段))中的RBC数量和血红蛋白浓度(上图)和骨髓中造血前体的形态学计数(下图)。\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,对比TBS-处理的MDS小鼠;#### $P < 0.001$ ,对比野生型小鼠。(B)用ActRIIB(L79D 25-131)-mFc(10mg/kg,每周两次,n=5)或TBS(n=4)治疗7周的MDS小鼠在大约12月龄结束(晚期阶段)时与小图A相同的终点。\* $P < 0.05$ ,对比TBS-处理的MDS小鼠。数据为均数 $\pm$ SEM。

[0058] 图14显示了多种脊椎动物ActRIIA蛋白和人ActRIIA(SEQ ID NOs:69-76)的多序列比对。

[0059] 图15显示了使用Clustal 2.1的得自人类IgG同种型的Fc结构域的多序列比对。铰链区用断续下划线指明。

[0060] 图16显示了ActRIIB(25-131)-hFc(SEQ ID NO:79)的完全的、未处理的氨基酸序列。TPA前导(残基1-22)和双-截短的ActRIIB细胞外结构域(残基24-131,使用基于SEQ ID NO:1中的天然序列编号)各自都有下划线。突出显示的是通过测序发现的在成熟的融合蛋白中是N-末端氨基酸的谷氨酸,其在相对于SEQ ID NO:1的第25位。

[0061] 图17A和17B显示了编码ActRIIB(25-131)-hFc的核苷酸序列(编码链显示在顶部,SEQ ID NO:80,而互补链显示在底部3'-5',SEQ ID NO:81)。编码TPA前导(核苷酸1-66)和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸73-396)的序列有下划线。还显示了ActRIIB(25-131)的对应的氨基酸序列。

[0062] 图18显示了编码ActRIIB(25-131)-hFc的替代核苷酸序列(编码链显示在顶部,SEQ ID NO:82,和互补链在底部3'-5'显示,SEQ ID NO:83)。这个序列赋予在初始转化体中的更大水平的蛋白表达,使得细胞系以一个更快速的过程发展。编码TPA前导(核苷酸1-66)和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸73-396)的序列有下划线,且ECD的野生型核苷酸序列中的取代(见图17)被突出显示。还显示了ActRIIB(25-131)的对应的氨基酸序列。

[0063] 发明详述

[0064] 1. 概观

[0065] 转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族包括共享共同的序列要素和结构基序的多种生长因子。已知这些蛋白对脊椎动物和无脊椎动物中的多种细胞类型发挥生物学作用。该家族

的成员在模式形成和组织特化的胚胎发育过程中执行重要的功能并可影响多种分化过程,包括脂肪发生、肌形成、软骨发生、心脏生成、造血、神经发生,和表皮细胞分化。通过操纵TGF- $\beta$ 家族成员的活动,在生物体中,经常可能引起重大的生理变化。例如,皮埃蒙特(Piedmontese)和比利时蓝牛(Belgian Blue cattle)品种在导致肌肉量显著增加的GDF8(也称为肌肉生长抑制素)基因中携带功能丧失(loss-of-function)突变[见例如,Grobet et al. (1997) Nat Genet. 17 (1):71-4]。此外,在人类中,GDF8的非活动性等位基因与增加的肌肉量以及据报告与异常的强健相关[见例如,Schuelke et al. (2004) N Engl J Med, 350:2682-8]。

[0066] TGF- $\beta$ 信号由I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异质配合物介导,其在配体刺激时使下游SMAD蛋白(如,SMAD蛋白1、2、3、5和8)磷酸化和激活[见例如,Massagué (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178]。这些I型和II型受体是跨膜蛋白,其包含具有半胱氨酸丰富区的配体-结合细胞外结构域、跨膜结构域,和具有预料的丝氨酸/苏氨酸特异性的细胞质结构域。I型受体对于信号传导是必要的。II型受体对于结合配体和激活I型受体是必需的。I和II型激活素受体在结合配体后形成稳定的配合物,导致II型受体对I型受体的磷酸化作用。

[0067] 两个相关的II型受体(ActRII), ActRIIA和ActRIIB,已被鉴定为用于激活素的II型受体[见例如,Mathews and Vale (1991) Cell 65:973-982;和Attisano et al. (1992) Cell 68:97-108]。除了激活素外,ActRIIA和ActRIIB可与几种其它TGF- $\beta$ 家族蛋白包括,例如,BMP6、BMP7、Nodal、GDF8和GDF11发生生物化学的相互作用[见例如,Yamashita et al. (1995) J. Cell Biol. 130:217-226;Lee和McPherron (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9306-9311;Yeo和Whitman (2001) Mol. Cell 7:949-957;和Oh et al. (2002) Genes Dev. 16:2749-54]。ALK4是用于激活素,特别是用于激活素A的一级I型受体,和ALK-7也可用作其它激活素,特别是用于激活素B的受体。在某些实施方案中,本公开内容涉及用一种或多种本文公开的抑制剂药物,特别是可拮抗激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、BMP9、BMP10、BMP6、GDF3、GDF11和/或GDF8的一种或多种的抑制剂药物拮抗ActRII受体的配体(也称为ActRII配体)。

[0068] 激活素是属于TGF- $\beta$ 超家族的二聚多肽生长因子。有3种主要的激活素形式(A、B和AB),它们为两个密切相关的 $\beta$ 亚单位的同/异二聚体(分别为 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 和 $\beta_A\beta_B$ )。人类基因组也编码激活素C和激活素E,其主要在肝中表达,而含有 $\beta_C$ 或 $\beta_E$ 的杂二聚形式也是已知的。

[0069] 在TGF- $\beta$ 超家族中,激活素是独特的多功能因子,其可刺激卵巢和胎盘细胞中的激素产生,支持神经元细胞存活,根据细胞类型对细胞周期的进展产生积极或消极影响,并且至少在两栖动物的胚胎中诱导中胚层分化[DePaolo et al. (1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512;Dyson et al. (1997) Curr Biol. 7:81-84;和Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]。此外,发现从受刺激的人类单细胞白血病细胞中分离出的红血球分化因子(EDF)是与激活素A相同的[Murata et al. (1988) PNAS, 85:2434]。已提示激活素A促进骨髓中的红细胞生成。在几种组织中,激活素信号传导被其相关的异二聚体,抑制素拮抗。例如,在从垂体释放促卵泡激素(FSH)期间,激活素促进FSH分泌和合成,同时抑制素预防FSH分泌和合成。可调节激活素生物活性和/或结合于激活素的其它蛋白包括卵泡抑素(FS)、卵泡抑素-相关蛋白(FSRP,也称为FLRG或FSTL3),和 $\alpha_2$ -巨球蛋白。

[0070] 如本文所述的,结合于“激活素A”的药物是特异性地结合于 $\beta_A$ 亚单位的药物,无论是在分离的 $\beta_A$ 亚单位的情况下,还是作为二聚配合物(如, $\beta_A\beta_A$ 同二聚体或 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)。在异二聚体配合物(如, $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)的情况下,结合于“激活素A”的药物是对配合物的 $\beta_A$ 亚单位内存在的表位有特异性的,但不结合于非- $\beta_A$ 亚单位内存在的表位(如,配合物的 $\beta_B$ 亚单位)。类似地,拮抗(抑制)“激活素A”的本文公开的药物是抑制如由 $\beta_A$ 亚单位介导的一或多种活性的药物,无论是在分离的 $\beta_A$ 亚单位的情况下,还是作为二聚配合物(如, $\beta_A\beta_A$ 同二聚体或 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体)。在 $\beta_A\beta_B$ 异二聚体的情况下,抑制“激活素A”的药物是特异性地抑制配合物的 $\beta_A$ 亚单位的一或多种活性,但不抑制非- $\beta_A$ 亚单位的活性(如,配合物的 $\beta_B$ 亚单位)的药物。这个原则也适用于结合和/或抑制“激活素B”、“激活素C”和“激活素E”的药物。本文公开的拮抗“激活素AB”的药物是抑制由 $\beta_A$ 亚单位介导的一种或多种活性和由 $\beta_B$ 亚单位介导的一种或多种活性的药物。

[0071] 生长和分化因子-8(GDF8)也被称为肌肉生长抑制素。GDF8是骨骼肌肉量的负调节剂。GDF8在发育中的和成人的骨骼肌中高度表达。转基因小鼠中的GDF8无效突变以骨骼肌的显著肥大和增生为特征[McPherron et al., Nature(1997) 387:83-90]。骨骼肌肉量的类似的增加在天然存在的GDF8突变的牛中是明显的[见例如, Ashmore et al. (1974) Growth, 38:501-507; Swatland和Kieffer(1994) J. Anim. Sci. 38:752-757; McPherron和Lee(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12457-12461; 和Kambadur et al. (1997) Genome Res. 7: 910-915]并且在人类中是更突出的[见例如, Schuelke et al. (2004) N Engl J Med 350: 2682-8]。研究也已显示与人类HIV-感染有关的肌肉萎缩伴有GDF8蛋白表达的增加[见例如, Gonzalez-Cadavid et al. (1998) PNAS 95:14938-43]。此外, GDF8可调节肌肉-特异性酶(如,肌酸激酶)的产生和调节成肌细胞增殖[见例如国际专利申请公布号WO 00/43781]。GDF8前肽可非共价结合于成熟的GDF8域二聚体,使其生物活性失活[见例如, Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263:6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; 和Brown et al. (1990) Growth Factors, 3:35-43]。结合于GDF8或结构上相关蛋白和抑制它们的生物活性的其它蛋白包括卵泡抑素,和潜在的卵泡抑素-相关蛋白[见例如, Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208:222-232]。

[0072] 生长和分化因子-11(GDF11),也称为BMP11,是分泌的蛋白[McPherron et al. (1999) Nat. Genet. 22:260-264]。GDF11在小鼠发育期间,在尾芽(tail bud)、肢芽(limb bud)、上颌及下颌弓(maxillary and mandibular arches),和背根神经节中表达[见例如, Nakashima et al. (1999) Mech. Dev. 80:185-189]。GDF11在中胚层和神经组织二者的成形中起着独特的作用[见例如, Gamer et al. (1999) Dev Biol., 208:222-32]。GDF11已显示是在发育中的小鸡肢体的软骨发生和肌生成中的一种负调节剂[见例如, Gamer et al. (2001) Dev Biol. 229:407-20]。GDF11在肌肉中的表达也提示其在以类似于GDF8的方式调节肌肉生长中的作用。此外, GDF11在脑中的表达提示, GDF11也可具有涉及神经系统功能的活性。有趣的是,已发现GDF11抑制嗅觉上皮的神经发生[见例如, Wu et al. (2003) Neuron. 37:197-207]。

[0073] 已经证明ActRII多肽(如, ActRIIA和ActRIIB多肽以及其变体如GDF诱捕剂)可被用来增加红细胞水平体内(见例如, WO 2008/046437和WO 2010/019261)。在本文描述的某些实施例中,已显示GDF诱捕剂多肽以与未修饰的ActRII多肽的对应样品比较的独特生物

特性为特征。这种GDF诱捕剂部分地以对于激活素A的结合亲和力的重大损失为特征,因此显著地降低拮抗激活素A活性的能力,但保留接近结合和抑制GDF11的野生型水平。GDF诱捕剂在增加红细胞水平方面比对应的未修饰的ActRIIB多肽更有效并且在多种贫血模型中具有有利的作用。因此数据指明观察到的ActRII多肽的生物活性在关于红细胞水平方面不依赖于激活素A抑制作用。然而,要注意到未修饰的ActRII多肽,其保留激活素A结合,仍然显示出体内增加红细胞的能力。而且,保留激活素A抑制作用的ActRII多肽,与具有降低对激活素A的结合亲和力的GDF诱捕剂比较,在某些应用中可能是更理想的,其中红细胞水平的更加适度的提高是可取的和/或其中一定水平的脱靶活性是可接受的(或甚至是合乎需要的)。应该注意到造血作用是一个由多种因素调节的复杂过程,包括促红细胞生成素、G-CSF,和铁稳态。术语“增加红细胞水平”和“促进红细胞形成”指临床上可观测的度量,例如红细胞比容、红细胞计数,和血红蛋白测量,并且打算对发生这种变化的机制保持中立。

[0074] 如本文所述的,已确定ActRII拮抗剂(抑制剂)可被用来增加血红蛋白水平并减轻MDS患者的输血负担。因此,这些数据指示ActRII抑制剂,任选地与一种或多种支持疗法联合,可被用来在有需要的个体中治疗骨髓增生异常综合征,治疗铁粒幼细胞性贫血,以及治疗或预防铁粒幼细胞性贫血或骨髓增生异常综合征的一种或多种并发症(如,贫血、输血要求、铁超载、嗜中性白血球减少症、脾肿大,并发展至急性骨髓性白血病),并且任选地在具有环形铁粒幼细胞和/或在骨髓细胞的SF3B1基因中的一种或多种突变的患者亚组中进行。

[0075] 令人惊奇地,ActRII拮抗剂还被观察到提高MDS患者的视力。因此,除了对治疗贫血的积极作用,ActRII抑制剂还可导致MDS患者的视力提高(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。此外,鉴于对MDS-相关的视力损失所报道的机理[Han et al. (2015) *J Glaucoma* (先于纸质印刷的电子文档公布(Epub ahead of print)); Brouzas et al. (2009) *Clinical Ophthalmology* 3:133-137],所述数据提示ActRII抑制剂也可对治疗其它类型的眼睛(眼部)疾病,特别是与缺血和血管性功能不全相关的那些眼睛疾病具有积极作用。

[0076] 因此,本公开内容的方法部分地涉及一种或多种ActRII拮抗剂(抑制剂),任选地与一种或多种支持疗法组合的用途,以在有需要的个体中治疗或预防眼睛的血管性疾病,在患有眼睛的血管性疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野),和/或治疗或预防眼睛的血管性疾病的一种或多种并发症。

[0077] 本说明书所用的术语一般具有它们在本领域、本公开内容的上下文和在采用每个术语的具体上下文中的通常意义。某些术语在下文或本说明书别处讨论,以在描述本公开内容的组合物和方法如何制备和使用它们方面向从业人员提供进一步指导。任何使用的术语的范围或意义从采用它们的本说明书上下文中将变得显而易见。

[0078] “同源的”,以其所有的语法形式和拼写变化,指具有“共同进化起源”的两个蛋白之间的相互关系,包括来自相同种族生物的超家族的蛋白,以及来自不同种族生物的同源蛋白。这样的蛋白(及其编码核酸)具有序列同源性,如通过它们的序列相似性反映的,不管是根据百分比同源性还是以特定残基或基序和保守的位置存在。术语“序列相似性”以其所有的语法形式,指可能分享或可能不分享共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应程度。然而,在通常使用和在本申请中,术语“同源的”,当用副词如“高度”修饰时,可指序列相似性并可能与共同进化起源有关,或可能与其无关。

[0079] “百分比(%)序列同一性”在相对于参考多肽(或核苷酸)序列时被定义为在比对

序列和引入缺口(如果必要)后,候选序列中与参考多肽(核苷酸)序列中的氨基酸残基(或核酸)相同的氨基酸残基(或核酸)的百分比,以实现最大百分比序列同一性,而不考虑任何保守替换作为序列同一性的一部分。用于测定百分比氨基酸序列同一性的目的的比对可以本领域技术人员技能范围内的多种方式实现,例如,使用公开提供的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定比对序列的适当参数,包括在被比较的全长序列上实现最大对齐所需要的任何算法。然而,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成%氨基酸(核酸)序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 编写,而源代码已经在美国版权办公室(U.S. Copyright Office), Wathington D.C., 20559的用户文档中存档,在那里它以美国版权注册号TXU510087 (U.S. Copyright Registration No. TXU510087) 注册。ALIGN-2程序可从Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. 公开获得,或可从源代码编译。ALIGN-2程序应该编译为在UNIX操作系统上使用,包括数字UNIX V4.0D。全部序列比较参数由比对-2(ALIGN-2) 程序设置且不改变。

[0080] “激动(Agonize)”,以其所有的语法形式,指激活蛋白和/或基因(如,通过激活或扩增蛋白基因表达或通过诱导非活性蛋白质进入活性状态)或增加蛋白和/或基因的活性的过程。

[0081] “拮抗”,以其所有的语法形式,指抑制蛋白和/或基因(如,通过抑制或降低蛋白的基因表达或通过诱导活性蛋白质进入非活性状态)或降低蛋白和/或基因的活性的过程。

[0082] 如本文所用的,除非另外说明,“基本上不结合于X”意欲指具有大于约 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ ,或更大的 $K_D$ (如,通过用来测定对“X”的 $K_D$ 的分析未检测到结合或对“X”只有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的药物。

[0083] 贯穿本说明书和权利要求书,与数值关联时使用的术语“约”和“大约”表示本领域技术人员熟悉的和可接受的一个准确的间隔。一般来说,这样的准确的间隔是 $\pm 10\%$ 。或者,且特别是在生物系统中,术语“约”和“大约”可意指在一个数量级之内的值,优选给定值的 $\leq 5$ -倍和更优选 $\leq 2$ -倍。

[0084] 本文公开的数字范围包含限定范围的数字。

[0085] 术语“一”和“一个”包括复数指代,除非在使用该术语的上下文中另外清楚地指明。术语“一”(或“一个”),以及术语“一种或多种”和“至少一个”可在本文互换使用。而且,“和/或”当在此使用时应视为两个或更多个指定特征或组分的每一个的具体公开(有或无其它特征或组分)。因此,如在本文的短语例如“A和/或B”中所用的术语“和/或”意欲包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独),和“B”(单独)。同样,术语“和/或”as用于短语如“A、B和/或C”意欲涵盖以下方面的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0086] 贯穿本说明书,单词“包含”或变化如“包括”或“含有”将被理解为暗示包含指定整数或整数组,但不排除任何其整数或整数组。

[0087] 2. ActRII拮抗剂

[0088] 本文提出的数据证实ActRII拮抗剂(抑制剂)(如,ActRII-介导的Smad 1、2、3、5和8信号转导的抑制剂)可被用来治疗眼睛的血管性疾病。特别是,已显示ActRII拮抗剂在提高MDS患者的视力方面是有效的。MDS患者的视力损失与缺血和/或血管功能不全介导的血

管应激有关 [Han et al. (2015) J Glaucoma (先于纸质印刷的电子文档公布); Brouzas et al. (2009) Clinical Ophthalmology 3:133-137]。因此,本公开内容部分地提供可单独使用或与一种或多种额外的支持疗法联合使用的多种ActRII拮抗剂,以在有需要的患者中治疗或预防眼睛的血管性疾病[如,黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变,糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变];在有需要的患有眼睛的血管性疾病患者中提高视力(如,视觉敏锐度和/或视野);和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症。

[0089] 在某些方面,根据本文公开的方法要使用的ActRII拮抗剂是包括截短的和其变体的ActRII多肽(ActRIIA或ActRIIB多肽)。在一些实施方案中,根据本文公开的方法要使用的优选的ActRII拮抗剂是不同的ActRII多肽,其保持对GDF11和/或GDF8的强烈至中度结合亲和力,但与对应的、非-变体的ActRII多肽比较,减弱对一种或多种ActRII配体(如,激活素A)的结合。这样的变体的ActRII多肽通常在本文称为“GDF诱捕剂”或“GDF诱捕剂多肽”。

[0090] 虽然可溶性ActRII多肽和其变体(如,GDF诱捕剂)可通过并非抑制ActRII配体[如,GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9的一种或多种的抑制可以是抑制一系列额外药物,包括,或许TGF- $\beta$ 超家族其它成员的活性的药物倾向的指示,而这样的共同的抑制作用可能对例如视力产生预期的影响]的机制影响视力或眼睛的血管性疾病的其它并发症,期望可用于根据本公开内容的方法的其它类型的ActRII配体和受体抑制剂,或抑制剂的组合,包括,例如,抗-GDF11抗体;抗-GDF8抗体;抗-ActRIIA抗体;抗-ActRIIB抗体;抗-ActRIIA/IIB抗体;抗-激活素抗体;抗-BMP6抗体;抗-GDF3抗体;和ti-BMP10抗体;抗-BMP9抗体;抑制GDF11、GDF8、ActRIIA、ActRIIB、激活素、BMP6、GDF3、BMP10和BMP9的一种或多种的表达(如,转录、翻译、从细胞分泌,或其组合)的核酸;以及GDF11、GDF8、ActRIIA、ActRIIB、激活素、BMP6、GDF3、BMP10和BMP9的一种或多种的小分子抑制剂。

[0091] A. ActRII多肽

[0092] 在某些方面,本公开内容涉及ActRII多肽。特别是,本公开内容提供单独或与一种或多种额外的活性剂或支持疗法联合使用ActRII多肽的方法,以在有需要的患者中治疗或预防眼睛疾病,特别是眼睛的血管性疾病[如,黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变,糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变],有需要的眼睛血

管性疾病患者中改善(增加)视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野),和/或治疗或预防眼睛的血管性疾病的一种或多种并发症。本文所用的术语“ActRII”指II型激活素受体的家族。这个家族包括激活素受体II型A(ActRIIA)和激活素受体II型B(ActRIIB)。

[0093] 如本文所用的,术语“ActRIIB”指通过诱变或其它修饰从这样的ActRIIB蛋白衍生的来自任何物种和变体的激活素受体II型B(ActRIIB)蛋白家族。参考本文的ActRIIB被理解为是参考任何一个目前鉴定的形式。ActRIIB家族的成员通常是跨膜蛋白,其包含含有半胱氨酸丰富区、跨膜结构域,和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域的配体-结合细胞外结构域。

[0094] 术语“ActRIIB多肽”包括包含ActRIIB家族成员的任何天然存在的多肽以及保持其有用的活性的任何变体(包括突变体、片段、融合,和拟肽形式)的多肽。这样的不同的ActRIIA多肽的实例在整个本公开内容以及在国际专利申请公布号W0 2006/012627中提供,其通过引用以其整体并入本文。对于本文描述的所有ActRIIB-相关多肽的氨基酸编号基于以下提供的人ActRIIB前体蛋白序列(SEQ ID NO:1)编号,除非另外特别指定。

[0095] 人ActRIIB前体蛋白序列如下列出:

1MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE  
 51GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY  
 101FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS  
 151LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR  
 201FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA  
 [0096] 251EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELCHV AETMSRGLSY  
 301LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK  
 351PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC  
 401KAADGPVDEY MLPFEEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL  
 451AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV  
 501TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1)

[0097] 信号肽用单下划线指示;细胞外结构域以粗字体指示;和有效的内源性N-连接的糖基化位点用双下划线指示。

[0098] 一个经处理的细胞外ActRIIB多肽序列如下列出:

[0099] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO:2)。

[0100] 在一些实施方案中,蛋白可用在N-末端的“SGR··”序列生产。细胞外结构域的C-末端“尾”用单下划线指示。具有“尾”缺失的序列( $\Delta$  15序列)如下列出:GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:3)。

[0101] 具有在SEQ ID NO:1的位置64的丙氨酸(A64)的一种ActRIIB形式在文献中也有报道[Hilden et al. (1994) Blood, 83 (8):2163-2170]。申请人已确认,包含具有A64取代的ActRIIB的细胞外结构域的ActRIIB-Fc融合蛋白具有对于激活素和GDF11的相对低的亲和力。相比之下,具有在位置64的精氨酸(R64)的相同ActRIIB-Fc融合蛋白具有在低纳摩尔至

高皮摩尔范围内对激活素和GDF11的亲合力。因此,具有R64的序列被用作本公开内容的人ActRIIB的“野生型”参考序列。

[0102] 一种具有在位置64的丙氨酸的ActRIIB形式如下列出:

1 MTAPWVALAL **LWGSLCAGSG** **RGEAETRECI** **YYNANWELER** **TNQSGLERCE**  
**51 GEQDKRLHCY** **ASWANSSGTI** **ELVKKGCWLD** **DFNCYDRQEC** **VATEENPQVY**  
**101 FCCCEGNFCN** **ERFTHLPEAG** **GPEVTYEPPTAPT** **LLTVLA** **YSLLPIGGLS**  
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR  
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA  
[0103] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNECHV AETMSRGLSY  
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK  
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG  
401 KAADGPVDEY MLPFEEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL  
451 AQLCVTIEEC WDHDAAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV  
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 4)

[0104] 信号肽用单下划线指示和细胞外结构域用粗字体指示。

[0105] 一个替代A64形式的经处理的细胞外ActRIIB多肽序列如下列出:GRGEAETRECIYY NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWL DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGN FCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO:5)

[0106] 在一些实施方案中,蛋白可用在N-末端的“SGR...”序列生产。细胞外结构域的C-末端“尾”用单下划线指示。具有“尾”缺失的序列( $\Delta$ 15序列)如下列出:

[0107] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWL DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO:6)

[0108] 编码人ActRIIB前体蛋白的核酸序列在下面显示(SEQ ID NO:7),由Genbank参考序列NM\_001106.3的核苷酸25-1560组成,其编码ActRIIB前体的氨基酸1-513。所示序列提供在位置64的精氨酸并可被修饰以提供丙氨酸来替代。信号序列是加下划线的。

[0109] 1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC

51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG  
101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA  
151 GGCAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC  
201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT  
251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC  
301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC  
351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA  
401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC  
451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCCTA  
501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC  
551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC  
601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA  
651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT  
701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC  
751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT  
801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT  
851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTCTCATA  
901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT  
951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA  
1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTGA GCCAGGGAAA  
1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC  
1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA  
1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC  
1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA  
1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA  
1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG  
1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC  
1401 TCGCTTGTC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT  
1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC  
1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)

[0110]

[0111]

编码处理的细胞外人ActRIIB多肽的核酸序列如下列出 (SEQ ID NO:8) :

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG  
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC  
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC  
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA  
[0112] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT  
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT  
301 GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC  
(SEQ ID NO:8)

[0113] 所示序列提供在位置64的精氨酸,并可经修饰以提供丙氨酸来替代。

[0114] 人ActRIIB细胞外结构域和人ActRIIA细胞外结构域的氨基酸序列的比对在图1中说明。这个比对指示在据信直接接触ActRII配体的两种受体内的氨基酸残基。例如,复合ActRII结构表明ActRIIB-配体结合袋部分地被残基Y31、N33、N35、L38-T41、E47、E50、Q53-K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78-N83、Y85、R87、A92和E94-F101限定。在这些位置,但预计保守的突变将被容忍。

[0115] 此外,ActRIIB一般都被很好地保存在脊椎动物中,伴有完全保守的大段细胞外结构域。例如,图2描述了人ActRIIB细胞外结构域与多种ActRIIB直系同源序列比较的多序列比对。结合于ActRIIB的许多配体也是高度保守的。因此,从这些比对,可能预测在对于正常ActRIIB-配体结合活性为重要的配体-结合结构域内的关键氨基酸位置以及预测可能耐受取代的氨基酸位置,而不显著地改变正常ActRIIB-配体结合活性。因此,可用于根据目前公开的方法的活性人ActRIIB变体可能包含在来自另一种脊椎动物ActRIIB的序列的对应位置上的一种或多种氨基酸,或可包含类似于人类或其它脊椎动物序列的残基。

[0116] 没有限制的意思,以下实施例说明这种限定活性的ActRIIB变体的方法。人类细胞外结构域(SEQ ID NO:2)的L46是非洲爪蟾(Xenopus)ActRIIB(SEQ ID NO:57)中的谷氨酸,所以这个位置可能会改变,并且任选地可改变至另一个疏水性残基,例如V、I或F,或非-极性残基如A。在人类细胞外结构域中的E52是在非洲爪蟾中的K,表示这个位点可耐受各种各样的变化,包括极性残基,例如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y和很可能是A。在人类细胞外结构域中的T93是在非洲爪蟾中的K,表示在这个位置可以耐受很大的结构变化,伴有有利的极性残基,例如S、K、R、E、D、H、G、P、G和Y。在人类细胞外结构域中的F108是在非洲爪蟾中的Y,因此Y或其它疏水性基团,例如I、V或L应该被容忍。在人类细胞外结构域中的E111是在非洲爪蟾中的K,表示在这个位置可以容忍荷电残基,包括D、R、K和H,以及Q和N。在人类细胞外结构域中的R112是在非洲爪蟾中的K,表示在这个位置可以容忍碱性残基,包括R和H。在人类细胞外结构域中的位置119的A是相对不够保守的,并且作为在啮齿动物(SEQ ID NOs:52和54)中的P和非洲爪蟾中的V出现,因而实质上在这个位置的任何氨基酸都应该被容忍。

[0117] 此外,ActRII蛋白已根据结构/功能特征,特别是涉及配体结合的技术进行了特征鉴定[Attisano et al. (1992) Cell 68(1):97-108;Greenwald et al. (1999) Nature Structural Biology 6(1):18-22;Allendorph et al. (2006) PNAS 103(20):7643-7648;Thompson et al. (2003) The EMBO Journal 22(7):1555-1566;以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的讲述,这些参考文献为如何生成保留一或多种所

需活性(如,配体-结合活性)的ActRII变体提供了充分的指导。

[0118] 例如,一种称为三指毒素折叠(three-finger toxin fold)的限定的结构基序对于由I型和II型受体结合的配体是重要的并由位于每个单分子受体的细胞外结构域内不同位置的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22;和Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]。因此,人ActRIIB的核心配体-结合结构域(如通过最外面的这些保守的半胱氨酸来划界)对应于SEQ ID NO:1的位置29-109(ActRIIB前体)。侧接这些半胱氨酸-分界的核心序列的结构上排序较少的氨基酸可被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36,或37个残基,而不必改变配体的结合。用于N-末端和/或C-末端截短的示例性ActRIIB细胞外结构域包括SEQ ID NOs:2、3、5和6。

[0119] Attisano et al.表明在ActRIIB的细胞外结构域C-末端脯氨酸结(knot)的缺失减少受体对激活素(activin)的亲合力。相对于ActRIIB(20-134)-Fc(其包含脯氨酸结区和完整的主体膜域),含有SEQ ID NO:1的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合蛋白,“ActRIIB(20-119)-Fc”,减少对GDF11和激活素的结合(见例如,美国专利号7,842,663)。然而,ActRIIB(20-129)-Fc蛋白保留类似的,但相对于野生型(即使脯氨酸结区被破坏)稍微减少活性。因此,在氨基酸134、133、132、131、130和129终止的ActRIIB细胞外结构域(相对于SEQ ID NO:1)都被期望是有活性的,但在134或133终止的构建体可能是更具活性的。类似地,在任何残基129-134(相对于SEQ ID NO:1)的突变预计不会大幅度改变配体-结合亲和力。为了支持这一点,本领域已知P129和P130的突变(相对于SEQ ID NO:1)不会显著降低配体结合。因此,本公开内容的ActRIIB多肽可早在氨基酸109结束(最终的半胱氨酸),然而,预期在109和119(例如109、110、111、112、113、114、115、116、117、118或119)或在它们之间形成末端会减少配体结合。氨基酸119(相对于现在的SEQ ID NO:1)是不够保守的,所以很容易被改变或截短。在128(相对于SEQ ID NO:1)或更后结束的ActRIIB多肽应保留配体-结合活性。在相对SEQ ID NO:1的119和127(如,119、120、121、122、123、124、125、126,或127)或在它们之间结束的ActRIIB多肽将具有中间结合能力。使用这些形式的任何一种可能是合乎需要的,这取决于临床或实验设置。

[0120] 在ActRIIB的N-末端,期望在氨基酸29或之前(相对于SEQ ID NO:1)开始的蛋白将保留配体-结合活性。氨基酸29代表初始半胱氨酸。在位置24的丙氨酸-至-天冬酰胺突变(相对于SEQ ID NO:1)引入N-连接的糖基化序列,而不实质影响配体结合[美国专利号7,842,663]。这证实在信号裂解肽(signal cleavage peptide)和半胱氨酸交联区之间的区(对应于氨基酸20-29)的突变是可完全容忍的。特别是,在位置20、21、22、23和24(相对于SEQ ID NO:1)开始的ActRIIB多肽应保留通用配体-结合活性,而在位置25、26、27、28和29(相对于SEQ ID NO:1)开始的ActRIIB多肽也期望保留配体-结合活性。已经证实,例如美国专利号7,842,663,令人惊奇地,在22、23、24或25开始的ActRIIB构建体将具有最大的活性。

[0121] 合起来说,ActRIIB的活性部分(如,配体-结合部分)的通式包含SEQ ID NO:1的氨基酸29-109。因此ActRIIB多肽可,例如,包含,基本上由,或由与在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29的任何一个残基开始(如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28,或29的任何一个开始)且在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109-134的任何一个位置结束(如,在氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、

128、129、130、131、132、133,或134的任何一个结束)的ActRIIB部分,具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。其它实施例包括在SEQ ID NO:1的从20-29(如,位置20、21、22、23、24、25、26、27、28,或29的任何一个)或21-29(如,位置21、22、23、24、25、26、27、28,或29的任何一个)的位置开始和在从119至134(如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133,或134)、119-133(如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133的任何一个)、129-134(如,位置129、130、131、132、133,或134的任何一个),或129-133(如,位置129、130、131、132或133的任何一个)的位置结束的多肽。其它实施例包括在SEQ ID NO:1的从20至24(如,位置20、21、22、23,或24)、21-24(如,任何一个of位置21、22、23,或24的任何一个),或22-25(如,位置22、22、23,或254的任何一个)的位置开始和从109至134(如,位置109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133,或1344的任何一个)、119-134(如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133,或1344的任何一个)或129-134(如,位置129、130、131、132、133,或1344的任何一个)的位置结束的构建体。也构思了在这些范围内的变体,特别是具有与SEQ ID NO:1的对应的部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的那些变体。

[0122] 本文描述的变化可以多种方式组合。在一些实施方案中,ActRIIB变体包含在配体-结合袋中的不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守的氨基酸改变,和在配体-结合袋中的位置40、53、55、74、79和/或82的0、一种或多种非-保守的变化。结合袋外侧的位点,在此变体可能特别容易被容忍,包括细胞外结构域的氨基和羧基末端(如上所述),和位置42-46和65-73(相对于SEQ ID NO:1)。在位置65的天冬酰胺-至-丙氨酸改变(N65A)实际上改善了在A64背景下的配体结合,因此预计对在A64背景下的配体没有有害的影响[美国专利号7,842,663]。这个改变很可能消除在A64背景下的N65的糖基化,因而表明该区的重大变化可能被容忍。虽然R64A改变的耐受性差,R64K却被很好地耐受,因而另一种碱性残基,例如H可容忍在位置64[美国专利号7,842,663]。另外地,本领域描述的诱变程序的结果指明在ActRIIB中有往往有利于保守的氨基酸的位置。在关于SEQ ID NO:1,这些包括位置80(酸性或疏水性氨基酸)、位置78(疏水性,和特别是色氨酸)、位置37(酸性,和特别是天冬氨酸或谷氨酸)、位置56(碱性氨基酸)、位置60(疏水性氨基酸,特别是苯丙氨酸或酪氨酸)。因此,本公开内容提供可在ActRIIB多肽中保存的氨基酸框架。可需要保守的其它位置列出如下:位置52(酸性氨基酸)、位置55(碱性氨基酸)、位置81(酸性)、98(极性或荷电的,特别是E、D、R或K),全部相对于SEQ ID NO:1。

[0123] 先前已经表明,将进一步的N-连接的糖基化位点(NXS/T)加入到ActRIIB细胞外结构域是完全-容忍的(见例如,美国专利号7,842,663)。因此,通常可在图1中限定的本公开内容的ActRIIB多肽的配体结合袋外侧位置引入NXS/T序列。引入非-内源性N-X-S/T序列的特别适合的位点包括氨基酸20-29、20-24、22-25、109-134、120-134或129-134(相对于SEQ ID NO:1)。N-X-S/T序列也可引入ActRIIB序列和Fc结构域或其它融合组分之间的接头中。可通过在相对于预先存在的S或T的正确位置引入N,或通过在对应于预先存在的N位置引入S或T,以最小的努力引入这样一个位点。因此,将创立N-连接的糖基化位点的合乎需要的变

化:A24N、R64N、S67N(可能与N65A变化结合)、E105N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S和R112T(相对于SEQ ID NO:1)。由于糖基化所提供的保护作用,预期要糖基化的任何S可改变为T,而不产生免疫位点。同样,预期要糖基化的任何T可改变为S。因而构思了变化S67T和S44T(相对于SEQ ID NO:1)。同样,在A24N变体中,可使用S26T变化。因此,本公开内容的ActRIIB多肽可以是具有一种或多种如上所述的额外的、非-内源性N-连接的糖基化共有序列的变体。

[0124] 在某些实施方案中,本公开内容涉及包含至少一种ActRIIB多肽的ActRII抑制剂,所述多肽包括其片段、功能变体,和修饰的形式。优选地,根据本公开内容使用的ActRIIB多肽是可溶性的(如,ActRIIB的细胞外结构域)。在一些实施方案中,根据本公开内容使用的ActRIIB多肽抑制(拮抗)一种或多种TGF- $\beta$ 超家族配体[如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]的活性(如,诱导Smad 1、2、3、5或8信号传导)。在一些实施方案中,根据本公开内容使用的ActRIIB多肽结合于一种或多种TGF- $\beta$ 超家族配体[如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,基本上由,或由与在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29的残基开始(如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的任何一个开始)和在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109-134位置结束(如,在氨基酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133,或134的任何一个结束)的ActRIIB部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成,其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置是酸性氨基酸(天然存在的酸性氨基酸D和E或人工的酸性氨基酸)。在某些优选的实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。在某些优选的实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成,其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置是酸性氨基酸。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、40、41、44、45、46、48、49、50、61、64、65、78和79的任何一个的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIB多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、40、41、44、45、46、48、49、50、61、64、65、78和79的任何一个的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%，或100%同一性的氨基酸序列组成，其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置是酸性氨基酸。在一些实施方案中，本公开内容的ActRIIB多肽由，或基本上由至少一种ActRIIB多肽组成，其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置不是酸性氨基酸(即，不是天然存在的酸氨基酸D或E或人工的酸性氨基酸残基)。

[0125] 在某些实施方案中，本公开内容涉及ActRIIA多肽。如本文所用的，术语“ActRIIA”指通过诱变或其它修饰从这样的ActRIIA蛋白衍生的来自任何物种和变体的激活素受体II型A(ActRIIA)蛋白家族。在此提及ActRIIA应被理解为是提及目前鉴定的形式的任何一个。ActRIIA家族的成员通常为由配体-结合细胞外结构域组成的跨膜蛋白，所述配体-结合细胞外结构域包含半胱氨酸丰富区、跨膜结构域，和具有预期的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞质结构域。

[0126] 术语“ActRIIA多肽”包括包含ActRIIA家族成员的任何天然存在的多肽以及保持有用的活性的任何其变体(包括突变体、片段、融合，和拟肽形式)的多肽。这样的不同的ActRIIA多肽的实例在整个本公开内容以及在国际专利申请公布号W0 2006/012627中提供，其通过引用以其整体并入本文。对于本文描述的所有ActRIIA-相关多肽的氨基酸编号是基于以下提供的人ActRIIA前体蛋白序列的编号(SEQ ID NO:9)，除非另外特别指定。

[0127] 典型的人ActRIIA前体蛋白序列如下列出：

```

1  MGAAAKLAFA VFLISCSSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC
51 YGDKKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV
101 YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYNIL LYSLVPLMLI
151 AGIVICAFFW YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLLEVKAR
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
[0128] 251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMMARGL
301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
401 CTAADGPVDE YMLPFEEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG
451 MAMLCETIEE CWDHDAEEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIIT TEDIVTVVTM
501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 9)

```

[0129] 信号肽用单下划线指示；细胞外结构域以粗字体指示；和电位、内源性N-连接的糖基化位点用双下划线指示。

[0130] 一个经处理的细胞外人ActRIIA多肽序列如下列出：

[0131] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO:10)

[0132] 细胞外结构域的C-末端“尾”用单下划线指示。具有“尾”缺失的序列(Δ15序列)如下列出：

[0133] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO:11)

[0134] 编码人ActRIIA前体蛋白的核酸序列在下面显示(SEQ ID NO:12)，作为Genbank参

考序列NM\_001616.4的以下的核苷酸159-1700。信号序列是下划线的。

[0135] 1 atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc  
 51 ttcaggtgct atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta  
 101 atgctaattg ggaaaaagac agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt  
 151 tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt ttgctacct ggaagaatat  
 201 ttctggttcc attgaaatag tgaacaaggg ttgttgctg gatgatatca  
 251 actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta  
 301 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt ttcttattt  
 351 tccggagatg gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc  
 401 caccctatta caacatcctg ctctattcct tgggtccact tatgtaatt  
 451 gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg tacaggcacc acaagatggc  
 501 ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga ccaggacca cccccactt  
 551 ctccattact aggtttgaaa ccaactgcagt tattagaagt gaaagcaagg  
 601 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc  
 651 tgtcaaaata ttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg  
 701 aagtctacag ttgcctgga atgaagcatg agaacatatt acagttcatt  
 751 ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgtgat gtggatcttt ggctgatcac  
 801 agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttctaag gctaatgtgg  
 851 tctcttgaa tgaactgtgt catattgcag aaacctggc tagaggattg  
 901 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc  
 951 catatctcac agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc  
 [0136] 1001 tgacagcttg cattgtgac ttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc  
 1051 aagtctgcag gcgatacca tggacaggtt ggtaccgga ggtacatggc  
 1101 tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat gcattttga  
 1151 ggatagatat gtatgccatg ggattagtc tatgggaact ggcttctgc  
 1201 tgtactgctg cagatggacc ttagatgaa tacatgttgc catttgagga  
 1251 ggaaattggc cagcatccat ctctgaaga catgcaggaa gttgttgtgc  
 1301 ataaaaaaaa gaggcctgtt ttaagagatt attggcagaa acatgctgga  
 1351 atggcaatgc tctgtgaac cattgaagaa tgttgggatc acgacgcaga  
 1401 agccagggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc cagatgcaga  
 1451 gactaaciaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg  
 1501 gtgacaaatg ttgacttcc tccaaagaa tctagtcta (SEQ ID NO: 12)

[0137] 编码处理的可溶性(细胞外)人ActRIIA多肽的核酸序列如下列出：

```

1  atacttgga gatcagaac tcaggagtgt ctttcttta atgctaattg
51  ggaaaaagac agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca
101 aagataaacg gcggcattgt tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc
[0138] 151 attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg gatgatatca actgctatga
201 caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta tattttgtt
251 gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttctattt tccggagatg
301 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc(SEQ ID NO:13)

```

[0139] ActRIIA在脊椎动物中是完全-保守的,伴有完全保守的大段细胞外结构域。例如,图14描述了人ActRIIA细胞外结构域与多种ActRIIA直系同源序列比较的多序列比对。结合于许多配体的ActRIIA也是高度保守的。因此,从这些比对,有可能预测对于正常ActRIIA-配体结合活性是重要的配体-结合结构域内的关键氨基酸位置以及预测很可能容忍取代而不显著地改变正常ActRIIA-配体结合活性的氨基酸位置。因此,根据目前公开的方法有用的、活性人ActRIIA变体可包含在来自另一种脊椎动物ActRIIA的序列的对应位置的一种或多种氨基酸,或可包含类似于人类或其它脊椎动物序列的残基。

[0140] 没有限制的意思,以下实施例说明限定活性的ActRIIA变体的这种方法。在人类细胞外结构域的F13是绵羊 (*Ovis aries*) (SEQ ID NO:70)、原鸡 (*Gallus gallus*) (SEQ ID NO:73)、大额牛 (*Bos Taurus*) (SEQ ID NO:74)、猫头鹰 (*Tyto alba*) (SEQ ID NO:75),和大卫鼠耳蝠 (*Myotis davidii*) (SEQ ID NO:76) ActRIIA中的Y,表示在这个位置容忍芳族残基,包括F、W和Y。人类细胞外结构域中的Q24是在大额牛 (*Bos Taurus*) ActRIIA中的R,表示在这个位置将容忍荷电的残基,包括D、R、K、H和E。人类细胞外结构域中的S95是在原鸡 (*Gallus gallus*) 和猫头鹰 (*Tyto alba*) ActRIIA中的F,表示这个位点可容忍各种各样的变化,包括极性残基,例如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y,和可能的疏水性残基如L、I或F。人类细胞外结构域中的E52是在绵羊 (*Ovis aries*) ActRIIA中的D,表示在这个位置将容忍酸性残基,包括D和E。人类细胞外结构域中的P29是相对不够保守的,作为在绵羊 (*Ovis aries*) ActRIIA中的S和在大卫鼠耳蝠 (*Myotis davidii*) ActRIIA中的L出现,因此在这个位置基本上应容忍任何氨基酸。

[0141] 此外,如上所讨论的,ActRII蛋白已根据结构/功能特征,特别是涉及配体结合的技术进行了特征鉴定 [Attisano et al. (1992) *Cell* 68(1):97-108; Greenwald et al. (1999) *Nature Structural Biology* 6(1):18-22; Allendorph et al. (2006) *PNAS* 103(20):7643-7648; Thompson et al. (2003) *The EMBO Journal* 22(7):1555-1566; 以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的讲述,这些参考文献为如何生成保留一或多种所需活性(如,配体-结合活性)的ActRII变体提供了充分的指导。

[0142] 例如,一种称为三指毒素折叠的限定的结构基序对于由I型和II型受体结合的配体是重要的并由位于每个单分子受体的细胞外结构域内不同位置的保守半胱氨酸残基形成 [Greenwald et al. (1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22; 和Hinck (2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]。因此,人ActRIIA的核心配体-结合结构域(如通过这些保守半胱氨酸的最外面来划界)对应于SEQ ID NO:9的位置30-110(ActRIIA前体)。因此,侧接这些半胱氨酸-分界的核心序列的结构上排序较少的氨基酸可截短N-末端的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28，或29个残基和C-末端的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24，或25个残基，而不必改变配体的结合。示例性ActRIIA细胞外结构域截短包括SEQ ID NOs:10和11。

[0143] 因此，ActRIIA的活性部分(如，配体结合)的通式是包含，基本上由，或由SEQ ID NO:9的氨基酸30-110组成的多肽。因此ActRIIA多肽可例如包含，基本上由，或由与在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸21-30的任何一个残基开始(如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30的任何一个开始)和在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸110-135的任何一个位置结束(如，在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或135的任何一个结束)的ActRIIA部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，或100%同一性的氨基酸序列组成。其它实施例包括在选自SEQ ID NO:9的21-30位置(如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30的任何一个开始)、22-30(如，在氨基酸22、23、24、25、26、27、28、29或30的任何一个开始)、23-30(如，在氨基酸23、24、25、26、27、28、29或30的任何一个开始)、24-30(如，在氨基酸24、25、26、27、28、29或30的任何一个开始)开始，和在选自SEQ ID NO:9的111-135的位置(如，在氨基酸111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135的任何一个结束)、112-135(如，在氨基酸112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135的任何一个结束)、113-135(如，在氨基酸113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135的任何一个结束)、120-135(如，在氨基酸120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135的任何一个结束)、130-135(如，在氨基酸130、131、132、133、134或135的任何一个结束)、111-134(如，在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134的任何一个结束)、111-133(如，在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133的任何一个结束)、111-132(如，在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131或132的任何一个结束)，或111-131(如，在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130或131的任何一个结束)结束的构建体。因此，本公开内容的ActRIIA可包含，基本上由，或由与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，或100%相同的多肽组成。任选地，本公开内容的ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，或100%相同的多肽，并包含在配体结合袋中的不超过1、2、5、10或15个保守氨基酸改变，和在配体结合袋中的位置40、53、55、74、79和/或82的零、一种或多种非-保守的变化(相对于SEQ ID NO:9)。

[0144] 在某些实施方案中，本公开内容涉及包含至少一种ActRIIA多肽的ActRII抑制剂，所述多肽包含其片段、功能变体，和修饰的形式。优选地，根据本公开内容使用的ActRIIA多肽是可溶性的(如，ActRIIA的细胞外结构域)。在一些实施方案中，根据本公开内容使用的

ActRIIA多肽抑制(拮抗)一种或多种TGF- $\beta$ 超家族配体[如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]的活性(如,诱导Smad 1、2、3、5或8信号传导)。在一些实施方案中,根据本公开内容使用的ActRIIA多肽结合于一种或多种TGF- $\beta$ 超家族配体[如,GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10和/或BMP9]。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIA多肽包含,基本上由,或由与在对应于SEQ ID NO:9氨基酸21-30的残基开始(如,在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30的任何一个开始)和在对应于SEQ ID NO:9的任何一个氨基酸110-135的位置结束(如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133,或135的任何一个结束)的ActRIIA部分具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIA多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,本公开内容的ActRIIA多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NO:9的氨基酸21-135至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开内容的ActRIIA多肽包含,由或基本上由与SEQ ID NOs:9、10、11、32、36和39的任何一个的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。

[0145] 在某些方面,本公开内容涉及GDF诱捕剂多肽(也称为“GDF诱捕剂”)。在一些实施方案中,本公开内容的GDF诱捕剂是在ActRII多肽(如,“野生型”或未修饰的ActRII多肽)的细胞外结构域(也称为配体-结合结构域)中包含一种或多种突变(如,氨基酸添加、缺失、取代,和其组合)的变体ActRII多肽(如,ActRIIA和ActRIIB多肽),以致变体的ActRII多肽具有一种或多种超过对应的野生型ActRII多肽的改变的配体-结合活性。在优选的实施方案中,本公开内容的GDF诱捕剂多肽保持至少一种与对应的野生型ActRII多肽类似的活性。例如,优选的GDF诱捕剂结合和抑制(如拮抗)GDF11和/或GDF8的功能。在一些实施方案中,本公开内容的GDF诱捕剂进一步结合和抑制TGF- $\beta$ 超家族的一种或多种配体。因此,本公开内容提供GDF诱捕剂具有对一种或多种ActRII配体的改变的结合特异性的多肽。

[0146] 为了举例说明,可选择一种或多种突变以增加变化的配体-结合结构域对GDF11和/或GDF8超过一种或多种ActRII-结合配体如激活素(激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E),特别是激活素A的选择性。任选地,改变的配体-结合结构域具有的对激活素结合的 $K_d$ 与对GDF11和/或GDF8结合的 $K_d$ 的比率,为相对于野生型配体-结合结构域的比率的至少2-、5-、10-、20-、50-、100-或甚至超过1000-倍。任选地,改变的配体-结合结构域具有的对抑制激活素的 $IC_{50}$ 与对抑制GDF11和/或GDF8的 $IC_{50}$ 的比率为相对于野生型配体-结合结构域的至少2-、5-、10-、20-、50-、100-或甚至超过1000-倍。任选地,改变的配体-结合结构域抑制GDF11和/或GDF8的 $IC_{50}$ 少于对抑制激活素的 $IC_{50}$ ,二者相差至少2-、5-、10-、20-、50-、100-或甚至1000倍。

[0147] 在某些优选的实施方案中,本公开内容的GDF诱捕剂被设计优先结合于GDF11和/

或GDF8(也称为肌肉生长抑制素)。任选地,GDF11和/或GDF8-结合诱捕剂还可结合于激活素B。任选地,GDF11和/或GDF8-结合诱捕剂还可结合于BMP6。任选地,GDF11和/或GDF8-结合诱捕剂还可结合于BMP10。任选地,GDF11和/或GDF8-结合诱捕剂还可结合于激活素B和BMP6。在某些实施方案中,本公开内容的GDF诱捕剂,例如与野生型ActRII多肽比较,减少对激活素(如,激活素A、激活素A/B、激活素B、激活素C、激活素E)的结合亲和力。在某些优选的实施方案中,本公开内容的GDF诱捕剂多肽减少对激活素A的结合亲和力。

[0148] ActRIIB蛋白的氨基酸残基(如,E39、K55、Y60、K74、W78、L79、D80,和F101)是在ActRIIB配体-结合袋中并帮助介导对其配体(包括,例如激活素A、GDF11和GDF8)的结合。因此,本公开内容提供包含ActRIIB受体的改变的-配体结合结构域(例如,GDF8/GDF11-结合结构域)的GDF诱捕剂多肽,所述ActRIIB受体包含那些氨基酸残基的一种或多种突变。

[0149] 作为一个具体的实例,ActRIIB的配体-结合结构域的荷正电的氨基酸残基Asp(D80)可突变为不同氨基酸残基,以产生优先结合于GDF8,但不是激活素的GDF诱捕剂多肽。优选地,相对于SEQ ID NO:1的D80残基被改变为选自以下的氨基酸残基:不荷电的氨基酸残基、荷负电的氨基酸残基,和疏水性氨基酸残基。作为一个更具体的实例,可改变SEQ ID NO:1的疏水性残基L79以赋予变化的激活素-GDF11/GDF8结合特性。例如,L79P取代以比激活素结合的更大程度减少GDF11结合。与此相反,用酸性氨基酸L79的替代[天冬氨酸或谷氨酸;L79D或L79E取代]大大地减少激活素A结合亲和力,同时保留GDF11结合亲和力。在示例性实施方案中,本文描述的方法利用GDF诱捕剂多肽,其为在对应于SEQ ID NO:1的位置79的位置包含酸性氨基酸(如,D或E)的变体ActRIIB多肽,任选地与一种或多种额外的氨基酸取代、添加或缺失组合。

[0150] 在一些实施方案中,为了这样的提高治疗效果或稳定性(如,保质期和耐体内蛋白水解降解)的目的,本公开内容构思了通过修饰ActRII多肽的结构来制备功能变体。变体可通过氨基酸取代、缺失、添加,或其组合产生。例如,合理的是期望独立地用异亮氨酸或谷氨酸替代亮氨酸,用谷氨酸替代天冬氨酸,用丝氨酸替代苏氨酸,或用结构上相关的氨基酸(如,保守的突变)类似的替代氨基酸对生成的分子的生物活性没有重大影响。保守的替代是在其侧链相关的氨基酸家族内发生的那些。本公开内容的多肽的氨基酸序列中的变化是否导致功能同系物可通过评价变体,以类似于野生型多肽的方式产生细胞反应,或结合一种或多种TGF- $\beta$ 配体的能力容易地测定,所述配体包括,例如BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、结节(noda)、胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)、神经素、阿霉素、persephin、MIS,和Lefty。

[0151] 在某些实施方案中,本公开内容构思了ActRII多肽的特异性突变,以改变多肽的糖基化。可选择这样的突变以引入或排除一种或多种糖基化位点,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一般包含三肽序列,天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸(其中“X”是任何氨基酸),其被适宜的细胞糖基化酶特异性地识别。改变也可通过添加一种或多种丝氨酸或苏氨酸残基至多肽的序列,或被一种或多种丝氨酸或苏氨酸残基在多肽的序列中取代(对于O-连接的糖基化位点)进行。在糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置的一个或两个的多种氨基酸取代或缺失(和/或在第二位置的氨基

酸缺失)导致修饰的三肽序列的非-糖基化。另一种增加多肽上的碳水化合物部分的数量是通过糖苷的化学或酶促偶联至多肽。取决于所用的偶联模式,糖可连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基;(c)游离巯基如半胱氨酸的那些;(d)游离羟基如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些;(e)芳族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些;或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。多肽上存在的一种或多种碳水化合物部分的除去可经化学和/或酶法完成。例如,化学去糖基化可能涉及多肽暴露在化合物三氟甲磺酸,或等效化合物中。这种治疗导致除连接糖(N-乙酰氨基葡萄糖或N-乙酰半乳糖胺)外的大部分或全部糖的裂解,同时保持氨基酸序列完整。通过如Thotakura et al. [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]所述,使用多种内-和外-糖苷酶可实现多肽上的碳水化合物部分的酶促裂解。多肽的序列可在适宜时根据所用表达系统的类型来调节,因为哺乳动物、酵母、昆虫,和植物细胞都可引入可受肽的氨基酸序列影响的不同糖基化模式。一般来说,用于人类的本公开内容的多肽可在提供适当的糖基化的哺乳动物细胞系中表达,例如HEK293或CHO细胞系,虽然其它哺乳动物表达细胞系也预期是有用的。

[0152] 本公开内容还构思了一种生成突变体,特别是ActRII多肽以及截短突变体的组合突变体的集合的方法。组合突变体的池对于鉴别功能活性(如,TGF- $\beta$ 超家族配体结合)ActRII序列尤其有用。筛选这样的组合库的目的可以是生成,例如具有改变的特性,例如改变的药代动力学或改变的配体结合的多肽变体。多种筛选分析在下文提供,且这样的分析可被用来评价变体。例如,可对ActRII变体结合于一种或多种TGF- $\beta$ 超家族配体(如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素AC、结节、胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)、神经素、阿霉素、persephin、MIS,和Lefty),预防TGF- $\beta$ 超家族配体结合于TGF- $\beta$ 超家族受体,和/或干扰由TGF- $\beta$ 超家族配体引起的信号传导的能力进行评价。

[0153] ActRII多肽的活性也可以基于细胞的或体内分析来测定。例如,可评价ActRII多肽对涉及视力的基因表达的影响。这在需要时可在一种或多种重组ActRII配体蛋白(如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、结节、胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)、神经素、阿霉素、persephin、MIS,和Lefty)的存在下执行,而细胞可被转染以产生ActRII多肽,和任选的ActRII配体。同样,ActRII多肽可施用于小鼠或其它动物,而视力可使用本领域公认的方法评价。类似地,例如,通过如本文描述的分析 and 那些本领域的常识可测试ActRII多肽或其变体的活性在血液细胞前体细胞中对这些细胞生长的任何影响。一种SMAD-反应性报道基因可用于这样的细胞系以监测对下游信号传导的影响。

[0154] 可以生成组合衍生的变体,其相对于参考ActRII多肽增加选择性或一般增加效力。这样的变体,当从重组DNA构建体中表达时,可用于基因疗法方案。同样,诱变可产生具有显著不同于对应的未修饰ActRII多肽的细胞内半衰期的变体。例如,改变的蛋白可导致对蛋白水解降解或导致未修饰的多肽破坏的其它细胞处理,或以别的方式灭活或者更稳定或者不太稳定。这样的变体,和编码它们的基因,可通过调节多肽的半衰期用来改变多肽配合物水平。例如,短的半衰期可产生更短暂的生物效应,并且当诱导型表达系统的部分,可

允许对细胞内重组多肽配合物水平进行更严格的控制。在Fc融合蛋白中,突变可在接头(如果有任何接头的话)和/或Fc部分中进行以改变ActRII多肽的半衰期。

[0155] 组合库可通过编码各自包含至少部分有效的ActRII序列的多肽库的退化基因库产生。例如,合成的寡核苷酸的混合物可经酶法结合到基因序列中,以致有效的ActRII编码核苷酸序列的退化集合可表达为单个多肽,或者,作为一组较大的融合蛋白(如,用于噬菌体展示)。

[0156] 有许多可从退化寡核苷酸序列生成有效的同系物库的方法。退化基因序列的化学合成可在自动DNA合成器中进行,然后可将合成的基因结合到用于表达的适宜的载体。退化寡核苷酸的合成是本领域熟知的[Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; 和Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477]。这样的技术已被用于其它蛋白的定向进化[Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al. (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; 以及美国专利号:5,223,409、5,198,346和5,096,815]。

[0157] 或者,其它形式的诱变可被用来生成组合库。例如,本公开内容的ActRII多肽可通过使用例如丙氨酸扫描诱变[Rufet al. (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al. (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al. (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 和Cunningham et al. (1989) *Science* 244:1081-1085], 通过接头扫描诱变[Gustin et al. (1993) *Virology* 193:653-660; 和Brown et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al. (1982) *Science* 232:316], 通过饱和诱变[Meyers et al., (1986) *Science* 232:613]; 通过PCR诱变[Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19]; 或通过随机诱变,包括化学诱变[Miller et al. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 和Greener et al. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34]从库筛选来生成和分离。接头扫描诱变,特别是在设置中,是一种用于识别截短(生物活性)形式的ActRII多肽的有吸引力的方法。

[0158] 本领域已知多种用于通过点突变和截短制备组合库的筛选基因产品,并且就此而言,用于筛选具有某些特性的基因产品的cDNA库的技术。这样的技术将一般适用于通过ActRII多肽的组合诱变生成的基因库的快速筛选。最广泛使用的筛选大基因库的技术通常包括将基因库克隆成可复制的表达载体,用生成的载体库转化适当的细胞,并在检测其产品的条件下表达组合基因,其中所需活性的检测促进相对容易地分离编码基因的载体。优选的分析包括TGF- $\beta$ 配体(如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、结节、胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)、神经素、阿霉素、persephin、MIS,和Lefty)结合分析和/或TGF- $\beta$ 配体-介导的细胞信号传导分析。

[0159] 如将由本领域技术人员识别的,大多数描述的突变、变体或本文描述的修饰可以核酸水平制备,或者在一些情况下,通过翻译后修饰或化学合成。这样的技术是本领域熟知的且其中的一些在本文描述。部分地,本公开内容鉴定ActRII多肽的功能活性部分(片段)和变体,其可用作生成和使用在本文描述的本发明范围内的其它不同ActRII多肽的指导。

[0160] 在某些实施方案中,本公开内容的ActRII多肽的功能活性片段可通过筛选从编码ActRII多肽(如,SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82和83)的核酸的对应片段重组生产的多肽获得。此外,所述片段可使用本领域已知的技术如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学经化学合成。所述片段可经(重组或通过化学合成)生产和测试,以鉴定那些可用作ActRII受体和/或一种或多种配体(例如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、结节、胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)、神经素、阿霉素、persephin、MIS,和Lefty)的拮抗剂(抑制剂)的肽基片段。

[0161] 在某些实施方案中,除了任何天然存在的ActRII(例如,ActRIIA或ActRIIB多肽),本公开内容的ActRII多肽还可包含翻译后修饰。这样的修饰包括,但不限于,乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。结果,ActRII多肽可含有非-氨基酸元素,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖,和磷酸盐。这样的非-氨基酸元素对配体捕获多肽的功能性的影响可如本文所述对其它ActRII变体进行测试。当本公开内容的多肽在细胞中通过裂解一种新生形式的多肽而产生时,翻译后处理对于所述蛋白的正确的折叠和/或功能也可能是重要的。不同的细胞(如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有对于这样的翻译后活性的特定细胞机械和特性机制,并可被选择以确保ActRII多肽的正确修饰和处理。

[0162] 在某些方面,本公开内容的ActRII多肽包括具有至少ActRII多肽(如,ActRIIA或ActRIIB多肽)的部分(域)和一种或多种异源性部分(域)的融合蛋白。这样的融合域的熟知的实例包括,但不限于,聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP),或人类血清白蛋白。可选择融合域以赋予所需特性。例如,一些融合域对于通过亲和层析分离融合蛋白是特别是有用的。为了亲和力纯化的目的,使用亲和层析的相关的基质,例如谷胱甘肽-、淀粉酶-,和镍-或钴-钶合的树脂。许多这样的基质可以“试剂盒”形式获得,例如用于(HIS<sub>6</sub>)融合配偶体的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress<sup>TM</sup>系统(Qiagen)。作为另一个实例,可选择融合域以促进ActRII多肽的检测。这样的检测域的实例包括多种荧光蛋白(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。容易获得特异性单克隆抗体的熟知的表位标记是容易获得的,包括FLAG、流感病毒血凝素(HA),和c-myc标记。在一些情况下,融合域具有蛋白酶裂解位点,例如对于因子Xa或凝血酶,其使得相关的蛋白酶部分消化融合蛋白并由此从中释放重组蛋白。释放的蛋白然后可通过随后的色谱分离法从融合域分离。可选择的其它类型的融合域包括多聚(如,二聚、四聚)域和功能域(其赋予额外的生物功能),包括,例如来自免疫球蛋白的恒定域(如,Fc结构域)。

[0163] 在某些方面,本公开内容的ActRII多肽含有一种或多种能够“稳定”多肽的修饰。所谓“稳定”意指增加体外半衰期、血清半衰期的任何物质,而不管这是否由于药物的破坏降低,肾脏清除降低,或其它药代动力学作用。例如,这样的修饰提高多肽的保质期,提高多

肽的循环半衰期,和/或减少多肽的蛋白水解降解。这样的稳定修饰包括,但不限于,融合蛋白(包括,例如融合蛋白包含ActRII多肽域和稳定剂域),糖基化位点的修饰(包括,例如,添加糖基化位点至本公开内容的多肽),和碳水化合物部分的修饰(包括,例如,从本公开内容的多肽除去碳水化合物部分)。如本文所用的,术语“稳定剂域”不仅指在融合蛋白的情况下的融合域(如,免疫球蛋白Fc结构域),而且还包括非蛋白修饰如碳水化合物部分,或非蛋白部分,例如聚乙二醇。在某些优选的实施方案中,ActRII多肽与稳定多肽(“稳定剂”域)的异源性域,优选与增加多肽的体内稳定性的异源性域融合。已知与免疫球蛋白的恒定域(如, Fc结构域)的融合赋予对广泛范围的蛋白的合乎需要的药代动力学特性。同样,与人类血清白蛋白的融合可赋予合乎需要的特性。

[0164] 可用于人类IgG1的Fc部分(G1Fc)的天然氨基酸序列的实例在下文显示(SEQ ID NO:14)。断续下划线指示铰链区,和实下划线指示具有天然存在的变体的位置。部分地,本公开内容提供多肽包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:14具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。根据用于SEQ ID NO:14的编号系统,G1Fc中天然存在的变体将包括E134D和M136L(见Uniprot P01857)。

```

1  THTCPPCPAP  ELLGGPSVFL  FPPKPKDTLM  ISRTPEVTCV  VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV  EVHNAKTKPR  EEQYNSTYRV  VSVLTVLHQD  WLNGKEYKCK
[0165] 101  VSNKALPAPI  EKTISKAKGQ  PREPQVYTLF  PSREEMTKNQ  VSLTCLVKGF
151  YPSDIAVEWE  SNGQPENNYK  TTPPVLDSDG  SFFLYSKLTV  DKSRWQQGNV
201  FSCSVMHEAL  HNHYTQKSL  LSPGK          (SEQ ID NO: 14)

```

[0166] 任选地,IgG1 Fc结构域具有在残基如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434的一种或多种突变。在某些情况下,具有这些突变的一种或多种(如,Asp-265突变)的突变体IgG1 Fc结构域相对于野生型Fc结构域降低了结合Fc $\gamma$ 受体的能力。在前体情况下,具有这些突变的一种或多种(如,Asn-434突变)的突变体Fc结构域相对于野生型IgG1 Fc结构域提高了结合MHC I类-相关Fc-受体(FcRN)的能力。

[0167] 可用于人类IgG2的Fc部分(G2Fc)的天然氨基酸序列的实例在下文显示(SEQ ID NO:15)。断续下划线指示铰链区和双下划线指示位置,其中序列中存在数据库冲突(根据UniProt P01859)。部分地,本公开内容提供多肽包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:15具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。

```

1  VECPPCPAPP  VAGPSVFLFP  PKPKDTLMIS  RTPEVTCVVV  DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV  HNAKTKPREE  QFNSTFRVVS  VLTVVHQDWL  NGKEYKCKV
[0168] 101  NKGLPAPIEK  TISKTKGQPR  EPQVYTLPPS  REEMTKNQVS  LTCLVKGFYP
151  SDIAVEWESN  GQPENNYKTT  PPMLDSDGSF  FLYSKLTVDK  SRWQQGNVFS
201  CSVMHEALHN  HYTQKSLSL  PGK          (SEQ ID NO: 15)

```

[0169] 可用于人类IgG3的Fc部分(G3Fc)的氨基酸序列的两个实例在下文显示。G3Fc中的铰链区可为其它Fc链的至多4倍长并含有由类似的17-残基区段前导的3个相同的15-残基区段。以下显示的第一G3Fc序列(SEQ ID NO:16)包含由单个15-残基区段组成的短铰链区,

而第二G3Fc序列(SEQ ID NO:17)包括全长铰链区。在各种情况下,断续下划线指示铰链区,和实下划线指示具有根据UniProt P01859的天然存在的变体的位置。部分地,本公开内容提供多肽包含,基本上由,或由与SEQ ID NOs:16和17具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 16)

```

[0170]

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

```

[0171] 在G3Fc中的天然存在的变体(例如,见Uniprot P01860)当转换为用于SEQ ID NO:16的编号系统时,包含E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y,和本公开内容提供包含含有这些变体的一种或多种的G3Fc结构域的融合蛋白。此外,人类免疫球蛋白IgG3基因(IGHG3)显示以不同铰链长度为特征的结构多态性[见Uniprot P01859]。特别地,变体WIS缺乏V区的大部分和CH1区的全部。它除了正常存在于铰链区的位置11外,还具有在位置7的额外的链间二硫键。变体ZUC缺乏V区的大部分和CH1区的全部,和铰链的部分。变体OMM可代表等位形式或另一个 $\gamma$ 链子集。本公开内容提供包含含有这些变体的一种或多种的G3Fc结构域的额外融合蛋白。

[0172] 可用于人类IgG4的Fc部分(G4Fc)的天然氨基酸序列的实例在下文显示(SEQ ID NO:18)。断续下划线指示铰链区。部分地,本公开内容提供多肽包含,基本上由,或由与SEQ ID NO:18具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的氨基酸序列组成。

```

1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
[0173] 101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 18)

```

[0174] Fc结构域中的多种工程改造的突变在本文提及G1Fc序列(SEQ ID NO:14)时提出,且在G2Fc、G3Fc和G4Fc的类似突变可从它们与G1Fc的比对得出(图15)。由于不相等的铰链长度,基于同种型比对的类似的Fc位置(图15)具有在SEQ ID NOs:14、15、16、17和18中的不同氨基酸数量。也可能意识到,当编号包含整个IgG1重链恒定域(由C<sub>H</sub>1、铰链、CH2和CH3区

组成)时,在由铰链、 $C_H2$ ,和 $C_H3$ 区(如,SEQ ID NOs:14、15、16、17和18)组成的免疫球蛋白序列中的给定氨基酸位置将由与Uniprot数据库中相同位置的不同数字鉴定。例如,在人类G1Fc序列(SEQ ID NO:14)、人类IgG1重链恒定域(Uniprot P01857)和人类IgG1重链中选择的 $C_H3$ 位置之间的对应关系如下所示。

| G1Fc<br>(在铰链区中的第一苏氨酸开始编号) | IgG1重链<br>恒定域<br>(在 $C_H1$ 开始编号) | IgG1重链<br>(Kabat et al., 1991的EU<br>编号方案*) |
|---------------------------|----------------------------------|--|
| Y127                      | Y232                             | Y349                                       |
| S132                      | S237                             | S354                                       |
| E134                      | E239                             | E356                                       |
| T144                      | T249                             | T366                                       |
| L146                      | L251                             | L368                                       |
| K170                      | K275                             | K392                                       |
| D177                      | D282                             | D399                                       |
| Y185                      | Y290                             | Y407                                       |
| K187                      | K292                             | K409                                       |

\* Kabat et al. (eds) 1991; pp. 688-696在*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.

[0175] 应理解融合蛋白(如,免疫球蛋白Fc融合蛋白)的不同的元素可以以与期望的功能一致的任何方式排列。例如,ActRII多肽域可被放置于异源性域的C-末端,或者,异源性域可被放置于ActRII多肽域的C-末端。ActRII多肽域和异源性域在融合蛋白中不需要相邻,并且任何一个域的C-或N-末端或所述域之间可包含额外的域或氨基酸序列。

[0177] 例如,ActRII受体融合蛋白可包含如在式A-B-C中提出的氨基酸序列。B部分对应于ActRII多肽域。A和C部分可独立地为0、1,或1个以上的氨基酸,并且当存在时,A和C部分都与B异源。A和/或C部分可经由连接序列连接于B部分。连接可富含甘氨酸(如,2-10、2-5、2-4、2-3个甘氨酸残基)或甘氨酸和脯氨酸残基并可例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单个序列或苏氨酸/丝氨酸和/或甘氨酸的重复序列,例如,GGG(SEQ ID NO:19)、GGGG(SEQ ID NO:20)、TGGGG(SEQ ID NO:21)、SGGGG(SEQ ID NO:22)、TGGG(SEQ ID NO:23)、SGGG(SEQ ID NO:24),或GGGGS(SEQ ID NO:25)单个序列,或重复序列。在某些实施方案中,ActRII融合蛋白包含如在式A-B-C中提出的氨基酸序列,其中A是前导(信号)序列,B由ActRII多肽域组成,和C是提高体内稳定性、体内半衰期、吸收/施用、组织定位或分布、蛋白配合物的形成和/或纯化的一种或多种的多肽部分。在某些实施方案中,ActRII融合蛋白包含如在式A-B-C中提出的氨基酸序列,其中A是TPA前导序列,B由ActRII受体多肽域组成,和C是免疫球蛋白Fc结构域。优选的融合蛋白包含在SEQ ID NOs:32、36、39、40、41、44、46、50、61、64、78和79中的任何一个中提出的氨基酸序列。

[0178] 在优选的实施方案中,根据本文描述的方法使用的ActRII多肽是分离多肽。如本文所用的,分离蛋白或多肽是已从其自然环境成分分离出来的蛋白或多肽。在一些实施方案中,本公开内容的多肽被纯化至大于95%、96%、97%、98%,或99%纯度,如通过例如电泳(如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(如,离子交换或反相HPLC)测定的。评价抗体纯度的方法是本领域熟知的[见例如,Flatman et al.,(2007) J.Chromatogr.B848:79-87]。在一些实施方案中,根据本文描述的方法使用的ActRII多肽是重组多肽。

[0179] 本公开内容的ActRII多肽可通过多种本领域-已知的技术生产。例如,本公开内容的多肽可使用标准蛋白化学技术合成,例如在Bodansky,M.Principles of Peptide Synthesis,Springer Verlag,Berlin(1993)和Grant G.A.(ed.),Synthetic Peptides:A User's Guide,W.H.Freeman and Company,New York(1992)中描述的那些。此外,自动肽合成仪是可市售获得的(如,Advanced ChemTech Model 396;Milligen/Bioscience 9600)。或者,本公开内容的多肽,包括片段或其变体,可使用本领域熟知的多种表达系统重组产生[如,大肠杆菌(E.coli)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、杆状病毒]。在进一步的实施方案中,修饰的或未修饰的本公开内容的多肽可通过使用例如蛋白酶,例如,胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶,胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶,或配对碱性氨基酸转化酶(PACE)经消化重组生产的全长ActRII多肽生产。计算机分析(使用可市售获得的软件,例如,MacVector、Omega、PCGene, Molecular Simulation, Inc.)可被用来鉴定蛋白水解裂解位点。或者,这样的多肽可使用化学裂解,从重组生成的全长ActRII多肽生产(如,溴化氰、羟胺等等)。

[0180] 本文描述的任何ActRII多肽(如,ActRIIA或ActRIIB多肽以及其变体如GDF诱捕剂)可与一种或多种额外的ActRII拮抗剂组合以达到预期效果(如,在有需要的患者中治疗或预防眼睛血管疾病,在有需要的患有眼睛的血管性疾病的患者中提高视力,和/或治疗或预防眼睛的血管性疾病的一种或多种并发症)。例如,ActRII多肽可与以下物质联合使用:i)一种或多种额外的ActRII多肽,ii)一种或多种ActRII拮抗剂抗体;iii)一种或多种小分子ActRII拮抗剂;iv)一种或多种多核苷酸ActRII拮抗剂;v)一种或多种卵泡抑素多肽;和/或vi)一种或多种FLRG多肽。

[0181] B. 编码ActRII多肽的核酸

[0182] 在某些实施方案中,本公开内容提供编码ActRII多肽(包括其片段,功能变体(如,GDF诱捕剂),和融合蛋白)的分离和/或重组核酸。例如,SEQ ID NO:12编码天然存在的人ActRIIA前体多肽,而SEQ ID NO:13编码经处理的ActRIIA的细胞外结构域。此外,SEQ ID NO:7编码天然存在的人ActRIIB前体多肽(上述R64变体),而SEQ ID NO:8编码经处理的ActRIIB的细胞外结构域(上述R64变体)。本核酸可以是单链或双链。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可例如用于制备基于如本文描述的ActRII的配体捕获多肽的方法中。

[0183] 如本文所用的,分离核酸指已从其自然环境成分分离的核酸分子。分离的核酸包括细胞中含有的核酸分子,所述细胞通常含有核酸分子,但核酸分子存在于染色体外或不同于其自然染色体位置的染色体位置。

[0184] 在某些实施方案中,编码本公开内容的ActRII多肽的核酸被理解为包括为SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82和83的任何一个的变体的核酸。变体核苷酸序列包括不同之处为一种或多种核苷酸取代、添加或缺失,包括等位基因变体

的序列,因此,将包括不同于SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82和83的任何一个指定的核苷酸序列的编码序列。

[0185] 在某些实施方案中,本公开内容的ActRII多肽由分离和/或重组的核酸序列编码,所述序列与SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82和83的任何一个具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性。本领域普通技术人员应意识到,与SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82和83互补的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%相同的核酸序列,和其变体,也在本公开内容的范围内。在进一步的实施方案中,本公开内容的核酸序列可与异源性核苷酸序列分离、重组和/或融合,或在DNA库中。

[0186] 在其它实施方案中,本公开内容的核酸还包括在非常严格的条件下与在SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82,和83指定的核苷酸序列,SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82和83的补体序列,或其片段杂交的核苷酸序列。如上所讨论的,本领域普通技术人员将容易地理解,促进DNA杂交的适当的严格条件可以是变化的。本领域普通技术人员将容易地理解,促进DNA杂交的适当的严格条件可以是变化的。例如,人们可在约45C,以6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)执行杂交,接着在50C洗涤(2.0x SSC)。例如,在洗涤步骤中的盐浓度可从约2.0x SSC的低强度(50C)至约0.2x SSC的高强度(50C)选择。此外,在洗涤步骤中的温度可从于室温(约22C)下的低氯化钠增加至约65C的高氯化钠。温度和盐均可变化,或温度或盐浓度可保持恒定,而其它变量是变化的。在一个实施方案中,本公开内容提供在室温下以6x SSC的低氯化钠杂交,接着在室温下以2x SSC洗涤的核酸。

[0187] 分离的不同于SEQ ID NOs:7、8、12、13、37、42、47、60、62、63、66、67、68、80、81、82,和83中列出核酸的核酸至遗传密码中的简并也在本公开内容的范围内。例如,许多氨基酸是由一个以上的三联体指定的。指定相同氨基酸的密码子,或同义词(例如,CaU和CAC是代表组氨酸的同义词)可导致不影响蛋白的氨基酸序列的“沉默”突变。然而,但期望导致所述蛋白的氨基酸序列中的变化的DNA序列多态性将在哺乳动物细胞中存在。本领域技术人员应意识到,编码特定蛋白的核酸的一种或多种核苷酸(至多约3-5%的核苷酸)中的这些变体可由于自然等位基因变体而存在于给定物种的个体中。任何和所有的这样的核苷酸变体和生成的氨基酸多态性是在本公开内容的范围内。

[0188] 在某些实施方案中,本公开内容的重组核酸可操作地连接到一种或多种表达构建体的调控核苷酸序列中。调控的核苷酸序列将一般适合于用来表达的宿主细胞。许多类型的适宜的表达载体和适合的调控的序列是本领域已知的并可用于多种宿主细胞,通常地,一种或多种调控的核苷酸序列可包括,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,和增强子或激活子序列。本公开内容涵盖了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是或者天然存在的启动子,或者合并一个以上的启动子元素的杂交启动子。表达构建体可存在附加体上的细胞中,如质粒,或表达构建体可插入到染色体中。在一些实施方案中,表达载体包含一个可选择的标记基因,以允许选择已转换的宿主细胞。可选择的标记基因是本领域熟知的并可随着所用的宿主细胞而变化。

[0189] 在某些方面,本文公开的主题核酸在表达载体中提供,所述表达载体包含编码ActRII多肽的核苷酸序列并可操作地连接于至少一种调控的序列。调控的序列是本领域公认的并被选择直接表达ActRII多肽。因此,术语调控的序列包括启动子、增强子,和其它表达控制元素。示例性调控的序列描述于Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,Ca(1990)中。例如,控制DNA序列表达的广泛种类的表达控制序列的任何一种,当可操作地连接于它时,可用于这些载体以表达编码ActRII多肽的DNA序列。这样的有用的表达控制序列包括,例如,SV40的早期和完全启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒即刻早期启动子、RSV启动子、lac系统, trp系统, TAC或TRC系统,其表达由T7 RNA聚合酶引导的T7启动子、 $\lambda$ 噬菌体的主要操纵子和启动子区、fd涂层蛋白的控制区、用于3-磷酸甘油酸酯激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶启动子,例如,Pho5、酵母 $\alpha$ -配对因子的启动子、杆状病毒系统和已知控制原核生物或真核生物细胞或其病毒的基因表达的其它序列的多面体启动子,及其多种组合。应该理解表达载体的设计可依赖于这样的因素,例如要转化的宿主细胞的选择和/或要表达所需的蛋白类型。此外,载体的复制数量,控制复制数量的能力和由载体编码的任何其它蛋白的表达,例如抗生素标记,也应该考虑。

[0190] 本公开内容的重组核酸可通过连接克隆的基因或其部分至适合在或者原核生物细胞、真核生物细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物),或二者中表达的载体而产生。用于重组ActRII多肽的生产的表达载体包括质粒和其它载体。例如,适合的载体包括以下类型的质粒:pBR322-衍生的质粒、pEMBL-衍生的质粒、pEX-衍生的质粒、用于原核生物细胞,例如大肠杆菌中的表达的pBTac-衍生的质粒和pUC-衍生的质粒。

[0191] 一些哺乳动物表达载体含有以促进载体在细菌中繁殖的两种原核生物序列,和在真核生物细胞中表达的一种或多种真核生物转录单位。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体是适合于真核生物细胞转染的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些用来自细菌质粒的序列,例如pBR322修饰,以促进在原核生物和真核生物细胞二者中的复制和耐药性选择。或者,病毒如牛乳头状瘤病毒(BPV-1),或爱泼斯坦-巴尔病毒(pHEBo、pREP-衍生的和p205)的衍生物可用于真核生物细胞中蛋白质的短暂表达。其它病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可在下文的基因疗法递送系统的描述中发现。用于质粒的制备和宿主生物体的转化的多种方法是本领域熟知的。对于用于原核生物和真核生物细胞二者的其它适合的表达系统、以及通用重组程序,见例如,分子克隆实验室手册(Molecular Cloning A Laboratory Manual),第3版,Ed.,由Sambrook,Fritsch和Maniatis编辑(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)在一些情况下,通过使用的杆状病毒表达系统表达重组多肽可能是合乎需要的。这样的杆状病毒表达系统的实例包括pVL-衍生的载体(如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW-衍生的载体(如pAcUW1),和pBlueBac-衍生的载体(如含有pBlueBac III的 $\beta$ -gal)。

[0192] 在优选的实施方案中,载体将被设计用于在CHO细胞,例如Pcmv-Script载体(Stratagene,La Jolla,Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)和pCI-neo载体(Promega,Madison,Wisc.)中生产主题ActRII多肽。很明显,本基因构建体可被用来引起主题ActRII多肽在培养基中繁殖的细胞中的表达,例如,以生产蛋白,包括融合蛋白或不

同的蛋白以供纯化。

[0193] 本公开内容还涉及用包含一种或多种主题ActRII多肽的编码序列的重组基因转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核生物或真核生物细胞。例如,本公开内容的ActRII多肽可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞(如,使用杆状病毒表达系统)、酵母,或哺乳动物细胞[如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系]中表达。其它适合的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0194] 因此,本公开内容进一步涉及生产主题ActRII多肽的方法。例如,用编码ActRII多肽的表达载体转染的宿主细胞可在允许ActRII多肽表达发生的适宜的条件下培养。多肽可从细胞和含有多肽的培养基的混合物分泌和分离。或者,ActRII多肽可保留在细胞质,或在膜碎片中,和可收获的、溶解的细胞和分离的蛋白中。细胞培养包括宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的适合的培养基是本领域熟知的。主题多肽可使用本领域已知的纯化蛋白的技术,包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳、对ActRII多肽的特异性表位的具有抗体特异性的免疫亲和纯化,和使用结合融合于ActRII多肽的域的试剂的亲亲和纯化(如,蛋白A柱可被用来纯化ActRII-Fc融合蛋白),从细胞培养基、宿主细胞,或二者分离。在一些实施方案中,ActRII多肽是融合蛋白含有促进其纯化的域。

[0195] 在一些实施方案中,通过一系列柱色谱步骤,包括例如3个或更多个以下步骤,以任何次序实现纯化:蛋白A色谱、Q琼脂糖凝胶色谱、苯基琼脂糖凝胶色谱、尺寸排阻色谱,和阳离子交换色谱。纯化可用病毒过滤和缓冲液交换完成。ActRII蛋白可纯化至如通过尺寸排阻色谱测定的>90%、>95%、>96%、>98%或>99%的纯度和如通过SDS PAGE测定的>90%、>95%、>96%、>98%,或>99%。纯度的目标水平应该是足以在哺乳动物系统,特别是非-人类灵长类动物,啮齿动物(小鼠),和人类中达到理想结果的水平。

[0196] 在另一个实施方案中,编码用于纯化前导序列,例如在重组ActRII多肽的所需部分的N-末端的聚-(His)/肠激酶裂解位点序列的融合基因,可允许通过亲和层析,使用Ni<sup>2+</sup>金属树脂纯化表达的融合蛋白。然后纯化的前导序列可随后通过用肠激酶处理移去,提供纯化的ActRII多肽。见例如,Hochuli et al. (1987) J.Chromatography 411:177;和Janknecht et al. (1991) PNAS USA 88:8972。

[0197] 制备融合基因的技术是熟知的。本质上,编码不同的多肽序列的多种DNA片段的连接根据常规技术,使用用于结合、限制酶消化的钝端或交错端(stagger-ended)末端执行,以提供适宜的末端,适宜时填充粘性末端,碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接,和酶促结合。在另一个实施方案中,融合基因可通过常规技术包括自动DNA合成仪合成。或者,基因片段的PCR扩增可使用在两个连续的基因片段之间产生互补的悬垂(overhangs)锚引物进行,其可随后猝灭生成嵌合基因序列。见例如,Current Protocols in Molecular Biology, eds.Ausubel et al., JohnWiley&Sons:1992。

[0198] C. 抗体拮抗剂

[0199] 在其它方面,本公开内容涉及拮抗ActRII活性(如,经由Smads 1、2、3、5和8抑制ActRII信号转导)的抗体,或抗体的组合。这样的抗体可结合于一种或多种TGF-β配体(如,BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、结节、胶质细胞衍生神经营养因

子(GDNF)、神经素、阿霉素、persephin、MIS,和Lefty)或一种或多种I型和/或II型受体(如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK5)。特别是,本公开内容提供一种使用抗体ActRII拮抗剂,或抗体ActRII拮抗剂的组合,单独或与一种或多种额外的支持疗法联合,以在有需要的患者中治疗或预防眼睛的血管性疾病[如,黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变];有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力(提高视觉敏锐度和/或视野);和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症的方法。

[0200] 在某些方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少GDF11的活性的抗体,或抗体的组合。在其它方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少GDF8的活性的抗体,或抗体的组合。在其它方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少GDF3的活性的抗体,或抗体的组合。在甚至其它方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少BMP6的活性的抗体,或抗体的组合。在还有的其它方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少BMP9的活性的抗体,或抗体的组合。在备选的方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是不结合和/或抑制活性of BMP9的抗体,或抗体的组合。在甚至其它方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少BMP10的活性的抗体,或抗体的组合。在备选的方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是不结合和/或抑制BMP10的活性的抗体,或抗体的组合。在进一步的方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素D)的活性的抗体,或抗体的组合。在一些实施方案中,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少激活素B的活性的抗体,或抗体的组合。在一些实施方案中,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少激活素A和激活素B的活性的抗体,或抗体的组合。或者,在一些实施方案中,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少激活素B,但不结合和/或抑制激活素A的活性的抗体,或抗体的组合。在甚至进一步的方面,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是不结合和/或抑制BMP9、BMP10,和激活素A的一种或多种的活性的抗体,或抗体的组合。

[0201] 在一些实施方案中,本公开内容的优选的抗体ActRII拮抗剂是结合和/或抑制至少GDF11和GDF8的活性的抗体,或抗体的组合,特别是在具有对GDF11和GDF8二者结合亲和力的多特异性抗体的情况下或在一种或多种抗-GDF11抗体和一种或多种抗-GDF8抗体组合的情况下。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11和/或GDF8活性的抗体,或抗体的组合还结合和/或抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11和/或GDF8活性的抗体,或抗体的组合还结合和/或抑制激活素B的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合

和/或抑制GDF11和/或GDF8活性的抗体,或抗体的组合不结合和/或抑制,或基本上不结合和/或抑制激活素A(如,具有对激活素A的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8和/或激活素活性的抗体,或抗体的组合还结合和/或抑制BMP6的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6活性的抗体,或抗体的组合还结合和/或抑制GDF3的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3活性的抗体,或抗体的组合还结合和/或抑制BMP10的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3和/或BMP10活性的抗体,或抗体的组合还结合和/或抑制BMP9的活性。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制BMP9(如,具有对BMP9的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制BMP10(如,具有对BMP10的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制BMP9或BMP10(如,具有对BMP9和BMP10的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制BMP9(如,具有对BMP9的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制BMP10(如,具有对BMP10的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制BMP9或BMP10(如,具有对BMP9和BMP10的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制激活素A(如,具有对激活素A的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制激活素A或BMP10(如,具有对激活素A和BMP10的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制激活素A或BMP9(如,具有 $1 \times 10^{-7}$  for 激活素A和BMP9的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性的抗体,或抗体组合不结合和/或抑制激活素A、BMP9或BMP10(如,具有对激活素A、BMP9和BMP10的大于 $1 \times 10^{-7}$ 的 $K_D$ 的抗体)。

[0202] 在另一个方面,本公开内容的ActRII拮抗剂是结合和/或抑制ActRII受体(如ActRIIA和/或ActRIIB受体)的活性的抗体,或抗体的组合。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少GDF11阻止ActRII受体的结合和/或激活。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少GDF8阻止ActRII受体的结合和/或激活。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少GDF3阻止ActRII受体的结合和/或激活。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少BMP6阻止ActRII受体的结合和/或激活。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少BMP10阻止

ActRII受体的结合和/或激活。在备选的实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合不阻止BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少BMP9阻止ActRII受体的结合和/或激活。在备选的实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合不阻止BMP9结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素E)阻止ActRII受体的结合和/或激活。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少激活素B结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合不阻止激活素A结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII受体抗体,或抗体的组合结合ActRII受体并通过至少激活素B结合和/或激活ActRII受体,但不阻止激活素A结合和/或激活ActRII受体。

[0203] 术语抗体在本文中以广泛的意义被使用并涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如,双特异性抗体),和抗体片段,只要它们显示出所需的抗原-结合活性。抗体片段指包含部分完整抗体的并非完整抗体的分子,其结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(如,scFv);和从抗体片段形成的多特异性抗体。见例如,Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Plückthun, 在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg和Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 和美国专利号5,571,894, 5,587,458, 和5,869,046中。本文公开的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在某些实施方案中,本公开内容的抗体包含包含一个附在其上的标记,并且能够被检测到(如,标记可以是放射同位素、荧光化合物、酶,或辅酶因子)。在优选的实施方案中,本公开内容的抗体是分离抗体。

[0204] 双抗体(Diabodies)是具有两个可以是二价或双特异性的抗原-结合位点的抗体片段。见例如,EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134 (2003); 和Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448。三价抗体(Triabodies)和四价抗体(tetrabodies)也描述于Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134中。

[0205] 单域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变域或全部或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人类单域抗体。见例如,美国专利号6,248,516。

[0206] 抗体片段可通过多种技术,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(如,大肠杆菌或噬菌体)生产来制备,如本文描述的。

[0207] 本文的抗体可具有任何类别。抗体的类别是指其重链具有的恒定域或恒定区类型。有5个主要类别的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,而这些中的几类可被进一步划分为亚类(同种型s),例如,IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别的免疫球蛋白被称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ , 和 $\mu$ 。

[0208] 一般说来,用于本文公开的方法中的抗体特异性地结合于其目标抗原,优选具有高结合亲和力。亲和力可表示为K<sub>d</sub>值和反映了内在的结合亲和力(如,以最小的亲合力效应),通常地,结合亲和力在体外测量,无论是否在无细胞或细胞-相关的背景下。本领域已

知的许多分析的任何一种,包括本文公开的那些,可被用来获得结合亲和力的测量包括,例如,表面等离子体共振(Biacore™分析)、放射标记的抗原结合分析(RIA),和ELISA。在一些实施方案中,本公开内容的抗体以至少 $1 \times 10^{-7}$ 或更强, $1 \times 10^{-8}$ 或更强, $1 \times 10^{-9}$ 或更强, $1 \times 10^{-10}$ 或更强, $1 \times 10^{-11}$ 或更强, $1 \times 10^{-12}$ 或更强, $1 \times 10^{-13}$ 或更强,或 $1 \times 10^{-14}$ 或更强的 $K_D$ 结合于它们的目标抗原(如GDF11、GDF8、ActRIIA、ActRIIB等等)。

[0209] 在某些实施方案中, $K_D$ 通过以下分析描述的,用感兴趣抗体的Fab版本及其目标抗原进行的RIA测量。Fabs对抗原的溶液结合亲和力在一系列滴定的未标记的抗原的存在下,通过用最小浓度的放射标记的抗原(如, $^{125}\text{I}$ -标记的)平衡Fab,然后用抗-Fab抗体-涂布的板捕获结合的抗原来测量[见例如,Chen et al. (1999) J.Mol.Biol.293:865-881]。为建立分析条件,多孔板(如,购自Thermo Scientific的MICROTITER®)用捕获抗-Fab抗体(如,得自Cappel Labs)涂布(如,过夜),随后优选于室温(如,大约23°C)用牛血清白蛋白阻断。在非-吸附板中,使放射标记的抗原与系列稀释的感兴趣的Fab混合[如,与抗-VEGF抗体、Fab-12的评价一致,在Presta et al., (1997) Cancer Res.57:4593-4599]。然后培养感兴趣的Fabs(优选)过夜,但培养可持续较长的时段(如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以供优选于室温下培养约1小时。然后除去溶液并用聚山梨醇酯20和PBS混合物洗涤板数次。当干燥板时,加入闪烁剂(如,得自Packard的MICROSCINT®),并在 $\gamma$ 计数器上计数板(如,得自Packard的TOPCOUNT®)。

[0210] 根据另一个实施方案,使用表面等离子体共振分析,使用例如BIACORE® 2000或BIACORE® 3000(Biacore, Inc., Piscataway, N.J.),以约10反应单位(RU)的固定抗原CM5芯片测量 $K_D$ 。简言之,根据供应商的指示,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活羧基甲基化糊精生物传感器芯片(CM5, Biacore, Inc.)。例如,在以 $5 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射以获得大约10反应单位(RU)的偶联蛋白之前,抗原可用10mM乙酸钠(pH 4.8)稀释至 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (约 $0.2 \mu\text{M}$ )。在注射抗原后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。为了动力学测量,注射在含有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20®)表面活性剂(PBST)的PBS中的2-倍系列稀释的Fab(0.78nM-500nM)。结合率( $k_{\text{on}}$ )和解离率( $k_{\text{off}}$ )使用,例如,简单的一对一的Langmuir结合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIACORE®评价软件版本3.2),通过同时拟合结合和解离感应图来计算。平衡解离常数( $K_D$ )被计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ [见例如,Chen et al., (1999) J.Mol.Biol.293:865-881]。如果通过以上的表面等离子体共振分析比例超过例如 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 时,然后在增加浓度的抗原的存在下,该比例可使用测量在PBS中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(如,激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)增加或降低的荧光猝灭技术测定,如用分光计,例如装配有止流仪的分光计(Aviv Instruments)或配有搅拌的8000-系列SLM-AMINCO®分光光度计(ThermoSpectronic)所测量的。

[0211] 如本文所用的,抗-GDF11抗体一般指能够以充分的亲和力结合GDF11的抗体,以致抗体可用作靶向GDF11的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-GDF11抗体与不相关的、非-GDF11蛋白的结合程度是少于抗体与GDF11的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,

抗-GDF11抗体结合在来自不同物种的GDF11中是保守的GDF11的表位。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗-GDF11抗体是可抑制GDF11活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-GDF11抗体可抑制GDF11结合于同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制GDF11-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-GDF11抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)。应该注意到GDF11与GDF8具有高的序列同源性,因此结合GDF11的抗体和/或,在一些情况下,也可结合和/或抑制GDF8。

[0212] 如本文所用的,抗-GDF8抗体一般指能够以充分亲和力结合于GDF8的抗体,以致抗体被用作靶向GDF8的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-GDF8抗体与不相关的、非-GDF8蛋白的结合程度是少于抗体与GDF8的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-GDF8抗体结合在来自不同物种的GDF8中是保守的GDF8的表位。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗-GDF8抗体是可抑制GDF8活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-GDF8抗体可抑制GDF8结合于同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制GDF8-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-GDF8抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的活性。应该注意到GDF8与GDF11具有高序列同源性,因此结合GDF8的抗体和/或,在一些情况下,也可结合和/或抑制GDF11。

[0213] 如本文所用的,抗-激活素抗体一般指能够以充分的亲和力结合激活素(如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素AB,和/或激活素E的一种或多种)的抗体,以致抗体被用作靶向激活素的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-激活素抗体与不相关的、非-激活素蛋白的结合程度是少于抗体与激活素的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-激活素抗体结合在来自不同物种的中是保守的激活素的表位。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗-激活素抗体是可抑制激活素活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-激活素抗体可抑制激活素从结合于同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制激活素-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-激活素抗体结合和/或抑制激活素B的活性。在一些实施方案中,本公开内容的抗-激活素抗体结合和/或抑制激活素A和激活素B的活性。在一些实施方案中,本公开内容的抗-激活素抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的活性。

[0214] 如本文所用的,抗-BMP6抗体一般指能够以充分的亲和力结合于BMP6的抗体,以致抗体被用作靶向BMP6的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-BMP6抗体与不相关的、非-BMP6蛋白的结合程度是少于抗体与BMP6的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-BMP6抗体结合在来自不同物种的BMP6中是保守的BMP6的表位。在某些优选的实施方案中,

本公开内容的抗-BMP6抗体是抑制BMP6活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-BMP6抗体可抑制BMP6结合于同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制BMP6-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-BMP6抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,结合于激活素A以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的活性。

[0215] 如本文所用的,抗-GDF3抗体一般指能够以充分的亲和力结合于GDF3的抗体,以致抗体被用作靶向GDF3的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-GDF3抗体与不相关的、非-GDF3蛋白的结合程度是少于抗体与GDF3的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-GDF3抗体结合在来自不同物种的GDF3中是保守的GDF3的表位。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗-GDF3抗体是可抑制GDF3活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-GDF3抗体抑制GDF3结合于同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制GDF3-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-GDF3抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的活性。

[0216] 如本文所用的,抗-BMP10抗体一般指能够以充分的亲和力结合于BMP10的抗体,以致抗体被用作靶向BMP10的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-BMP10抗体与不相关的、非-BMP10蛋白的结合程度是少于抗体与BMP10的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-BMP10抗体结合在来自不同物种的BMP10中是保守的BMP10的表位。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗-BMP10抗体是可抑制BMP10活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-BMP10抗体抑制BMP10结合于同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制BMP10-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-BMP10抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的活性。

[0217] 如本文所用的,抗-BMP9抗体一般指能够以充分的亲和力结合BMP9的抗体,以致抗体被用作靶向BMP9的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-BMP9抗体与不相关的、非-BMP9蛋白的结合程度是少于抗体与BMP9结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-BMP9抗体结合来自不同物种的BMP9中是保守的BMP9的表位。在某些优选的实施方案中,本公开内容的抗-BMP9抗体是可抑制BMP9活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-BMP9抗体可抑制BMP9结合同源受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)和/或抑制BMP9-介导的同源受体的信号转导(激活),如由ActRII受体介导的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-BMP9抗体,特别是在多特异性抗体的情况下,基本上不结合和/或抑制激活素A(如,以大于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合于激活素A或具有相对适度的结合,例如,约 $1 \times 10^{-8}$ M或约 $1 \times 10^{-9}$ M)的活性。

[0218] 抗-ActRII抗体指能够以充分的亲和力结合ActRII (ActRIIA和/或ActRIIB)的抗体,以致抗体被用作靶向ActRII的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗-ActRII抗体与不相关的、非-ActRII蛋白的结合程度是少于抗体与ActRII的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%,或少于1%,如例如通过放射免疫分析(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗-ActRII抗体结合在来自不同物种的ActRII中是保守的ActRII的表位。在优选的实施方案中,本公开内容的抗-ActRII抗体是可抑制ActRII活性的拮抗剂抗体。例如,本公开内容的抗-ActRII抗体可抑制一种或多种选自激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E、GDF11、GDF8、激活素A、BMP6和BMP7的ActRII配体结合ActRII受体和/或抑制这些配体之一激活ActRII信号传导(如,Smad 1、2、3、5和8信号传导)。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII抗体抑制GDF11结合来自激活ActRII信号传导的ActRII受体和/或抑制GDF11。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII抗体抑制GDF8结合ActRII受体和/或抑制GDF8激活ActRII信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRII抗体抑制GDF8和GDF11结合ActRII受体和/或抑制GDF8和GDF11激活ActRII信号传导。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制BMP6结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制BMP6和BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制激活素(如,激活素B)和BMP6结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8从结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制激活素(如,激活素B)和BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的抗-ActRII抗体还抑制激活素(如,激活素B)、BMP6,和BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的抗-ActRIIA抗体基本上不抑制激活素A结合于ActRII受体和/或基本上不抑制激活素A-介导的ActRII信号传导的激活。

[0219] 人ActRII受体和配体(如,GDF11、GDF8、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、BMP6、BMP10,ActRIIB,和ActRIIA)的核酸和氨基酸序列是本领域熟知的,因而根据本公开内容使用的抗体拮抗剂通常可通过技术人员基于本领域的知识和本文提高的教导制备。

[0220] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。嵌合抗体指抗体其中部分重链和/或轻链衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分源自不同来源或物种。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4,816,567;和Morrison et al., (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855中。在一些实施方案中,嵌合抗体包含非-人类可变区(如,可变区衍生的从小鼠、大鼠、仓鼠、兔子,或非-人类灵长类动物,例如猴)和人类恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体是其中类别或子集已从母体抗体的类别改变的“类别转换的”抗体。一般来说,嵌合抗体包括其抗原-结合片段。

[0221] 在某些实施方案中,嵌合本文提供的抗体是人源化抗体。人源化抗体指嵌合抗体

包含氨基酸残基从非-人类hyper可变区(HVRs)和氨基酸残基从人类框架区(FRs)。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,和通常两个可变域,其中所有的或基本上所有的HVRs(如,CDRs)对应于非-人抗体的那些,和所有的或基本上所有的FRs对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可包含至少部分源自人抗体的抗体恒定区。”人源化形式”的抗体,如非-人抗体,指已经历人源化的抗体。

[0222] 人源化抗体和制备它们的方法例如在Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619-1633有评述并进一步描述于例如Riechmann et al.,(1988)Nature 332:323-329;Queen et al.(1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033;美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321,和7,087,409;Kashmiri et al.,(2005)Methods 36:25-34[描述SDR(a-CDR)移植];Padlan,Mol.Immunol.(1991)28:489-498(描述”再涂层”);Dall'Acqua et al.(2005)Methods36:43-60(描述”FR同源重组”);Osborn et al.(2005)Methods 36:61-68;和Klimka et al.Br.J.Cancer(2000)83:252-260(描述对FR同源重组的”有指导的选择”途径)。

[0223] 可用于人源化的人类框架区包括但不限于:使用”最适合的”方法选定的框架区域[见例如,Sims et al.(1993)J.Immunol.151:2296];从轻链或重链可变区特定亚基的人抗体的共有序列衍生的框架区[见,如Carter et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;和Presta et al.(1993)J.Immunol.,151:2623];人类成熟的(体细胞变体)框架区或人类种系框架区[见例如,Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619-1633];和从筛选FR库衍生的框架区[见例如,Baca et cd.,(1997)J.Biol.Chem.272:10678-10684;和Rosok et cd.,(1996)J.Biol.Chem.271:22611-22618]。

[0224] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。人抗体可使用多种本领域已知的技术生产。人抗体通常描述于van Dijk和van de Winkel(2001)Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74和Lonberg(2008)Curr.Opin.Immunol.20:450-459中。

[0225] 人抗体可通过施用免疫原(如,GDF11多肽、GDF8多肽、ActRIIA多肽,或ActRIIB多肽)于转基因动物来制备,所述转基因动物已经修饰以生产完整人抗体或具有响应于抗原挑战的人类可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分人类免疫球蛋白基因座,其取代内源性免疫球蛋白基因座,或其存在外染色体中或随机整合进入动物的染色体。在这样的转基因动物中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被激活。对于从转基因动物获得人抗体的方法的评述,见例如,Lonberg(2005)Nat.Biotechnol.23:1117-1125;美国专利号6,075,181和6,150,584(描述XENOMouse™技术);美国专利号5,770,429(描述HuMab®技术);美国专利号7,041,870(描述K-MMouse®技术);和美国专利申请公布号2007/0061900(描述Veloci小鼠®技术)。来自这样的动物生成的完整抗体的人类可变区可例如,通过与不同人类恒定区合并进一步修饰。

[0226] 本文提供的人抗体也可通过基于杂交瘤的方法制备。用于生产人类单克隆抗体的人类骨髓瘤和小鼠-人类异源骨髓瘤细胞系已描述于[见例如,Kozbor J.Immunol.,(1984)133:3001;Brodeur et al.(1987)Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63,Marcel Dekker,Inc.,New York;和Boerner et al.(1991)J.Immunol.,147:86]中。经由人类B-细胞杂交瘤技术生成的人抗体也被描述于Li et al.,

(2006)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562中。额外的方法包括描述于例如美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系生产单克隆人类IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue(2006)26(4):265-268(2006)(描述人类-人类杂交瘤)。人类杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein(2005)Histol.Histopathol.,20(3):927-937(2005)和Vollmers和Brandlein(2005)Methods Find Exp.Clin.Pharmacol,27(3):185-91中的那些。

[0227] 人类本文提供的抗体也可通过分离选自人类-衍生的噬菌体展示库的Fv克隆变量-域序列生成。然后可使这样的变量-域序列与所需人类恒定域合并。从抗体库选择人抗体的技术是本文描述的。

[0228] 例如,通过筛选用于具有所需的一种或多种活性的抗体的组合库可分离本公开内容的抗体。本领域已知生成噬菌体-展示库和筛选这样的具有所需结合特征的抗体库的多种方法。这样的方法例如在Hoogenboom et al.(2001)in Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien et al.,ed.,Human Press,Totowa,N.J.中有评述并例如在McCafferty et al.(1991)Nature348:552-554;Clackson et al.,(1991)Nature 352:624-628;Marks et al.(1992)J.Mol.Biol.222:581-597;Marks和Bradbury(2003)in Methods in Molecular Biology 248:161-175,Lo,ed.,Human Press,Totowa,N.J.;Sidhu et al.(2004)J.Mol.Biol.338(2):299-310;Lee et al.(2004)J.Mol.Biol.340(5):1073-1093;Fellouse(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472;和Lee et al.(2004)J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132中进一步描述。

[0229] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因的所有组成部分通过聚合酶链反应(PCR)分开克隆和在噬菌体库中随机重组,然后可如在Winter et al.(1994)Ann.Rev.Immunol.,12:433-455中所述对其进行抗原-结合噬菌体筛选。噬菌体通常展示抗体片段,或者作为单链Fv(scFv)片段或者作为Fab片段。来自免疫来源的库提供对免疫原(如,GDF11、激活素B、ActRIIA,或ActRIIB)的高-亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。或者,幼稚的所有组成部分可被克隆(如,从人类)以提供单一来源的抗体,所述抗体针对广泛范围的非自抗原和自抗原,而没有由Griffiths et al.(1993)EMBO J,12:725-734描述的任何免疫作用。最后,幼稚的库也可通过从干细胞克隆未重新排列的V-基因区段和使用含有编码高度可变CDR3区和实现体外重新排列的随机序列的PCR引物经合成制备,由Hoogenboom和Winter(1992)J.Mol.Biol.,227:381-388所述。描述人抗体噬菌体库的专利出版物包括,例如:美国专利号5,750,373,和美国专利公报号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0230] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如,双特异性抗体。多特异性抗体(通常为单克隆抗体)具有对一或多种(如,2、3、4、5或6或更多种)抗原上的至少两个不同表位(如,2、3、4、5或6或更多种)的结合特异性。

[0231] 在某些实施方案中,本公开内容的多特异性抗体包含两种或更多种结合特异性,具有至少一种对GDF11表位的结合特异性,和任选的对不同ActRII配体(如,GDF8、激活素、BMP6和/或BMP10)和/或ActRII受体(如,ActRIIA和/或ActRIIB受体)上的表位的一或多种额外的结合特异性。在某些实施方案中,多特异性抗体可结合于GDF11的两个或更多个不同的表位。优选地,具有部分地对GDF11表位的结合亲和力的本公开内容的多特异性抗体可被

用来抑制GDF11活性(如,结合和/或激活ActRII受体的能力),并任选地抑制一种或多种不同ActRII配体(如,GDF8、激活素、BMP6和/或BMP10)和/或ActRII受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)的活性。在某些优选的实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少GDF8。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制激活素A。

[0232] 在某些实施方案中,本公开内容的多特异性抗体包含两种或更多种结合特异性,即至少一种对GDF8表位的结合特异性,和任选的一种或多种对不同ActRII配体(如,GDF11、激活素、BMP6、BMP10、BMP9和/或GDF3)和/或ActRII受体(如,ActRIIA和/或ActRIIB受体)上的表位的额外的结合特异性。在某些实施方案中,多特异性抗体可结合于GDF8的两个或更多个不同表位。优选地,本公开内容的具有部分地对GDF8表位的结合亲和力的多特异性抗体可被用来抑制GDF8活性(如,结合和/或激活ActRII受体的能力),并任选地抑制一种或多种不同ActRII配体(如,GDF11、激活素、BMP6、BMP10、BMP9和/或GDF3)和/或ActRII受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)的活性。在某些优选的实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少GDF11。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素E)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF8多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少激活素B。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制激活素A。任选地,本公开内容的多特异性抗体that结合和/或抑制GDF8进一步结合和/或抑制至少BMP6。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少BMP9。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制BMP9。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少BMP10。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制BMP10。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF8的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少GDF3。

[0233] 在某些实施方案中,本公开内容的多特异性抗体包含两种或更多种结合特异性,即至少一种对GDF11表位的结合特异性,和任选的一种或多种对不同ActRII配体(如,GDF8、激活素、BMP6、BMP10、BMP9和/或GDF3)和/或ActRII受体(如,ActRIIA和/或ActRIIB受体)上的表位的额外的结合特异性。在某些实施方案中,多特异性抗体可结合于GDF11的两个或更多个不同表位。优选地,本公开内容的具有部分地对GDF11表位的结合亲和力的多特异性抗体可被用来抑制GDF11活性(如,结合和/或激活ActRII受体的能力),并任选地抑制一种或多种不同ActRII配体(如,GDF8、激活素、BMP6、BMP10、BMP9和/或GDF3)和/或ActRII受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)的活性。在某些优选的实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少GDF8。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素E)。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少激活素B。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制激活素A。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少BMP6。任选地,本公开

内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少BMP9。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制BMP9。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少BMP10。在一些实施方案中,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制BMP10。任选地,本公开内容的结合和/或抑制GDF11的多特异性抗体进一步结合和/或抑制至少GDF3。

[0234] 在某些实施方案中,本公开内容的多特异性抗体包含两种或更多种结合特异性,即至少一种对激活素的结合特异性,和任选的一种或多种对不同ActRII配体(如,GDF11、GDF8、BMP6、BMP10、BMP9和/或GDF3)和/或ActRII受体(如,ActRIIA和/或ActRIIB受体)上的表位的额外的结合特异性。在某些实施方案中,多特异性抗体可结合于激活素的两个或更多个不同表位或可结合于不同类型的激活素(如,结合激活素A表位和结合激活素B表位)上的两个或更多个不同表位。优选地,本公开内容的具有部分地对激活素表位的结合亲和力的多特异性抗体可被用来抑制激活素活性(如,结合和/或激活ActRII受体的能力),和任选地抑制一种或多种不同ActRII配体(如,GDF11、GDF8、BMP6、BMP10、BMP9和/或GDF3)和/或ActRII受体(如,ActRIIA或ActRIIB受体)的活性。在某些优选的实施方案中,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体还结合和/或抑制至少GDF11。任选地,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体还结合和/或抑制至少GDF8。在一些实施方案中,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体B。在一些实施方案中,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体B基本上不结合于和/或基本上抑制激活素A。任选地,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体还结合和/或抑制至少BMP6。任选地,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体还结合和/或抑制至少BMP9。在一些实施方案中,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制BMP9。任选地,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体还结合和/或抑制至少BMP10。在一些实施方案中,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体基本上不结合于和/或基本上抑制BMP10。任选地,本公开内容结合和/或抑制激活素的多特异性抗体还结合和/或抑制至少GDF3。

[0235] 具有3或更多个功能抗原结合位点的工程改造的抗体,包括“8价抗体”也包括在本文中(见例如,US 2006/0025576A1)。

[0236] 在某些实施方案中,本文公开的抗体是单克隆抗体。单克隆抗体指从基本上同源的抗体群获得的抗体,即,包含所述群的各个抗体是同一性的和/或结合相同表位,除了例如含有天然存在的突变或在生产单克隆抗体制剂的过程中发生突变的可能的不同抗体,这样的变体一般以微量存在。与多克隆抗体制剂相反,其通常包括针对不同表位的不同抗体,每个单克隆抗体的单克隆抗体制剂是针对抗原上的单个表位。因此,修饰的“单克隆”表明抗体的特性是从基本上同源的抗体群获得的,因而不能被解释为需要通过任何特定的方法产生抗体。例如,根据本方法使用的单克隆抗体可通过多种技术,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体-展示方法,和利用转基因动物含有全部或部分人类免疫球蛋白基因座的方法、本文描述的制备单克隆抗体的此类方法和其它示例性方法制备。

[0237] 例如,通过使用源自GDF11、抗-蛋白/抗-肽抗血清或单克隆抗体的免疫原可通过标准方案制备[见例如,抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)(1988)由

Harlow和Lane编辑,Cold Spring Harbor Press]。哺乳动物,例如小鼠、仓鼠,或兔可用GDF11多肽免疫原形式的、能够引起抗体反应的抗原片段,或融合蛋白免疫。赋予蛋白或肽免疫原性的技术包括对载体的轳合或本领域熟知的其它技术。GDF11多肽的免疫原的部分可在辅助剂的存在下施用。通过检测血浆或血清中的抗体滴度,可以监测免疫进展情况。可使用免疫原作为抗原,采用标准ELISA或其它免疫分析以评价抗体产生的水平和/或结合亲和力的水平。

[0238] 用GDF11的抗原制剂免疫动物后,可获得抗血清并且如果需要,多克隆抗体可从血清分离。为生产单克隆抗体,产生抗体的细胞(淋巴细胞)可从免疫动物收获以及通过标准体细胞融合程序与免疫细胞如骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞。这样的技术是本领域熟知的,并包括例如杂交瘤技术[见例如,Kohler和Milstein(1975)Nature,256:495-497]、人类B细胞杂交瘤技术[见例如,Kozbar et al.(1983)Immunology Today,4:72]和EBV-杂交瘤技术以生产人类单克隆抗体[Cole et al.(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.pp.77-96]。杂交瘤细胞可经免疫化学筛选以供生产与GDF11多肽特异性地反应的抗体,和从包含这样的杂交瘤细胞的培养物分离的单克隆抗体。

[0239] 在某些实施方案中,一种或多种氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区,从而生成Fc-区变体。Fc-区变体可包含含有在一种或多种氨基酸位置的氨基酸修饰(如,取代,缺失和/或添加)的人类Fc-区序列(如,人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0240] 例如,本公开内容构思了具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使得它为应用的合乎需要的候选物,其中抗体的体内半衰期是重要的,但对于其某些效应子功能[如,补体-依赖性细胞毒性(CDC)和抗体-依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)]是不必要的或有害的。可执行体外和/或体内细胞毒性分析以证实CDC和/或ADCC活性的减少/缺失。例如,可执行Fc受体(FcR)结合分析以确保抗体缺乏Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的原始细胞、NK细胞仅表达Fc $\gamma$ R1,而单核细胞表达Fc $\gamma$ R1、Fc $\gamma$ R2和Fc $\gamma$ R3。在造血细胞上的FcR表达概述于,例如,Ravetch和Kinet(1991)Annu.Rev.Immunol.9:457-492。评价感兴趣分子的ADCC活性的体外分析的非-限制性实例描述于美国专利号5,500,362;Hellstrom,I.et al.(1986)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063;Hellstrom,I et al.(1985)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502;美国专利号5,821,337;和Bruggemann,M.et al.(1987)J.Exp.Med.166:1351-1361中。或者,可采用非-放射性分析方法(如,ACT1<sup>TM</sup>、对于流式细胞仪的非-放射性的细胞毒性分析;CellTechnology,Inc.Mountain View,Calif.;和CytoTox96<sup>®</sup>非-放射性的细胞毒性分析,Promega,Madison,Wis.)。用于这样的分析的有用的效应子细胞包括外周血液单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者,或额外地,感兴趣分子的ADCC活性可在体内,例如,在如由Clynes et al.(1998)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656中公开的动物模型中评价。也可进行C1q结合分析以证实抗体不能结合C1q,因而缺乏CDC活性[见例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA]。为评价补体激活,可执行CDC分析[见例如,Gazzano-Santoro et al.(1996)J.Immunol.Methods 202:163;Cragg,M.S.et al.(2003)Blood101:1045-1052;和Cragg,M.S.和M.J.Glennie(2004)Blood 103:2738-2743]。FcRn结合和体内清楚/半衰期测定也可使用本领域已知的方法执行[见例如,Petkova,S.B.et al.(2006)Int.Immunol.18(12):1759-1769]。

[0241] 具有减少的效应子功能的本公开内容的抗体包括Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的一种或多种取代的那些(美国专利号6,737,056)。这样的Fc突变体包括具有氨基酸位置265、269、270、297和327的两个或更多个取代的Fc突变体,包括具有残基265和297对丙氨酸的取代的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0242] 在某些实施方案中,可能合乎需要的是创立半胱氨酸-工程改造的抗体,例如,“thioMAbs”,其中抗体的一种或多种残基用半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中,取代的残基发生在抗体的可接近的位点。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫羟基定位于抗体的可接近的位点并可被用来使抗体结合至其它部分,例如药物部分或连接-药物部分,以创立免疫共轭,如本文进一步描述的。在某些实施方案中,任何一种或多种以下残基可用半胱氨酸取代:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程改造的抗体可如例如在美国专利号7,521,541中描述生成。

[0243] 此外,用来筛选抗体以鉴定合乎需要的抗体的技术可影响获得的抗体的特性。例如,如果抗体被用来结合溶液中的抗原,测试溶液结合可能是合乎需要的。可利用多种不同技术测试抗体和抗原之间的相互作用,以鉴定特别需要的抗体。这样的技术包括ELISAs、表面等离子体共振结合分析(如,Biacore™结合分析,Biacore AB,Uppsala,Sweden)、三明治试验(如,IGEN International,Inc.,Gaithersburg,Maryland的顺磁珠系统)、蛋白质印迹法、免疫沉淀分析,和免疫组织化学。

[0244] 在某些实施方案中,构思了本文提供的抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体。例如,提高结合亲和力和/或抗体和/或结合多肽的其它生物特性可能是合乎需要的。抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体可通过将适宜的修饰引入核苷酸序列中编码抗体和/或结合多肽,或通过肽合成制备。这样的修饰包括,例如,从抗体和/或结合多肽的氨基酸序列内缺失和/或插入残基和/或取代抗体和/或结合多肽的氨基酸序列内的残基。可进行缺失、插入,和取代的任何组合以达到最终的构造,只要最终的构建体具有所需的特征,例如,靶-结合(GDF11、GDF8、ActRIIA和/或ActRIIB结合)。

[0245] 可在HVRs中进行改变(如,取代),例如,以提高抗体亲和力。这样的变化可在HVR“热点(hotspots)”,即在体细胞成熟过程中经历高频率的突变的密码子编码的残基(见例如,Chowdhury(2008)Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或SDRs(a-CDRs)上进行,对生成的变体VH或VL测试结合亲和力。本领域描述了从二级库构造和选择亲和性成熟[见例如,Hoogenboom et al.,in Methods in Molecular Biology 178:1-37,0'Brien et al.,ed.,Human Press,Totowa,N.J.,(2001)]。在亲和性成熟的一些实施方案中,通过多种方法的任何一种(如,易错PCR、链移动,或寡核苷酸-定向诱变)将多样性引入到选择成熟的可变基因中。然后创立二级库。再筛选库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR-定向途径,其中几个HVR残基(如,一次4-6个残基)被任意排列。涉及抗原结合的HVR残基可例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模明确识别。CDR-H3和CDR-L3尤其往往是目标。

[0246] 在某些实施方案中,取代、插入,或缺失可在一种或多种HVRs内发生,只要这样的变化基本上不减少抗体结合抗原的能力。例如,基本上不减少结合亲和力的保守的变化(如,如本文提供的保守的取代)可在HVRs中制备。这样的变化可HVR“热点”或SDRs的外侧。在以上提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或者是未改变的,或含有不超过

1、2或3个氨基酸取代。

[0247] 一种可能成为诱变目标的抗体和/或结合多肽的残基或区的有用方法被称为“丙氨酸扫描诱变”，如由Cunningham和Wells (1989) Science, 244:1081-1085描述的。在这种方法中，残基或目标残基组(如，荷电的残基如arg、asp、his、lys和glu)被鉴定且被中性或荷负电氨基酸(如，丙氨酸或聚丙氨酸)替代，以测定抗体或结合多肽与抗原的相互作用是否受到影响。可在显示对初始取代具有功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的取代。备选地，或额外地，抗原-抗体配合物的晶体结构可被用来鉴定抗体和抗原的接触点。这样的接触残基和邻近残基可作为用于替换的候选物被定为目标或被排除。可筛选变体以测定它们是否含有所需特性。

[0248] 氨基-酸序列插入包括范围在从一个残基到多肽含有一百或更多个残基的长度的氨基-和/或羧基-末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其它插入的变体包括抗体N-或C-末端至酶(如，对于ADEPT)或多肽的融合，其增加抗体的血清半衰期。

[0249] 在某些实施方案中，本文提供的抗体和/或结合多肽可经进一步的修饰以含有本领域已知且可容易地获得的额外的非-蛋白质部分。适合于抗体和/或结合多肽衍生的部分包括但不限于水-可溶性聚合物。水-可溶性聚合物的非-限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧基甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷(trioxane)、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(或者均聚物或者随机共聚物)，和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷(propylene oxide)/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(如，甘油)、聚乙烯醇，及其混合物。聚乙二醇丙醛可由于其在水中的稳定性而在生产中具有优点。聚合物可具有任何分子量，并可以是分支或未分支的。连接于抗体和/或结合多肽的聚合物的数量可以变化，并且如果一个以上的聚合物连接在一起，它们可以是相同或不同的分子。一般说来，基于以下考虑，包括，但不限于，要改进的抗体和/或结合多肽的特殊性质或功能，抗体衍生物和/或结合多肽衍生物是否将在限定的条件下用于疗法，可以确定用于衍生化的聚合物的数量和/或类型。

[0250] 本文公开的任何ActRII拮抗剂抗体(如，抗-激活素A抗体、抗-激活素B抗体、抗-激活素C抗体、抗-激活素E抗体、抗-GDF11抗体、抗-GDF8抗体、抗-BMP6抗体、抗-BMP10抗体、抗-ActRIIA抗体、抗-GDF3抗体和/或抗-ActRIIB抗体)可与一种或多种额外的ActRII拮抗剂药剂组合以达到预期效果[治疗或预防有需要的患者的眼睛血管疾病；有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力(如，提高视觉敏锐度和/或视野)；和/或治疗或预防眼睛的血管性疾病的一种或多种并发症]。例如，ActRII拮抗剂抗体可与i)一种或多种额外的ActRII拮抗剂抗体，ii)一种或多种ActRII多肽；iii)一种或多种小分子ActRII拮抗剂；iv)一种或多种多核苷酸ActRII拮抗剂；v)一种或多种卵泡抑素多肽；和/或vi)一种或多种FLRG多肽联合使用。

[0251] D. 小分子拮抗剂

[0252] 在另一个方面，本公开内容涉及拮抗ActRII活性(如，经由Smads 1、2、3、5和8抑制ActRII信号转导)的小分子，或小分子的组合。特别是，本公开内容提供一种单独或与一种或多种额外的支持疗法联合使用ActRII的小分子拮抗剂(抑制剂)，或小分子拮抗剂的组

合,以在有需要的患者中治疗或预防眼睛的血管性疾病[如,黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变];有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野);和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症的方法。

[0253] 在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少GDF11活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少GDF8活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少GDF3活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少BMP6活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少BMP9活性。或者,在其它实施方案中,优选的小分子本公开内容的ActRII拮抗剂不抑制BMP9活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少BMP10活性。或者,在其它实施方案中,优选的小分子本公开内容的ActRII拮抗剂不抑制BMP10活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素E)活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素E)活性。在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少激活素B活性。在一些实施方案中,本发明的优选的小分子ActRII拮抗剂存在不抑制激活素B活性。

[0254] 在一些实施方案中,本公开内容的优选的ActRII拮抗剂是小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,其抑制至少GDF11和GDF8活性。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11和/或GDF8活性的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E)。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11、GDF8和/或激活素活性的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制BMP6。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6活性的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制GDF3。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3活性的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制BMP10。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3和/或BMP10活性的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制BMP9。在一些实施方案中,本公开内容的抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3、BMP9和/或BMP10活性的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合不抑制激活素A。

[0255] 在一些实施方案中,本公开内容的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,抑制

ActRII受体(如ActRII-介导的Smad 1、2、3、5和8信号转导)。例如,在一些实施方案中,本公开内容的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,抑制GDF11结合和/或激活ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)。在一些实施方案中,本公开内容的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,抑制GDF8结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,本公开内容的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合,抑制GDF11和GDF8结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制BMP6结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制BMP6和BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8从结合和/或激活ActRII受体的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制激活素(如,激活素B)和BMP6结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合还抑制激活素(如,激活素B)和BMP10结合和/或激活ActRII受体。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8结合和/或激活ActRII受体的小分子拮抗剂,或小分子拮抗剂的组合不抑制激活素A结合和/或激活ActRII受体。

[0256] 小分子ActRII拮抗剂可以是直接或间接的抑制剂。例如,间接的小分子ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的小分子的组合,可抑制GDF11、GDF8、激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6、GDF3、BMP10, ActRIIA和/或ActRIIB的至少一种或多种的表达(如,转录、翻译、细胞分泌,或其组合)。或者,间接小分子ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的小分子的组合,可直接结合于例如一种或多种配体[如,GDF11、GDF8,GDF3、激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E) BMP6和/或BMP10]、受体(ActRIIA和/或ActRIIB),或ActRII-配体信号传导途径的信号传导成分(如,Smad 1、2、3、5和8的一种或多种)。一种或多种间接和一种或多种直接小分子ActRII拮抗剂的组合可根据本文公开的方法使用。

[0257] 本公开内容的结合有机小分子拮抗剂可使用已知的方法(见例如,PCT公布号W0 00/00823和W0 00/39585)鉴定和化学合成。一般来说,本公开内容的小分子拮抗剂的大小通常少于约2000道尔顿,或者大小少于约1500、750、500、250或200道尔顿,其中这样的有机小分子能够结合(优选特异性地)本文描述的多肽(如,GDF11、GDF8,ActRIIA,和ActRIIB)。这样的小分子拮抗剂可使用无需过度实验的熟知的技术鉴定。在这一点,注意到筛选能够结合多肽靶的分子的有机小分子库的技术是本领域熟知的(见例如,国际专利公布号W000/00823和W000/39585)。

[0258] 本公开内容的结合有机小分子可以是,例如,醛、酮、脞、脞、缩氨基脲、卡巴肼、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的脞、酰脞、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、脲、氨基甲酸酯、碳酸酯、缩酮、酮缩硫醇(thioketals)、乙缩醛、硫乙缩醛、芳基卤化物、芳基磺酸酯、

烷基卤化物、烷基磺酸酯、芳族化合物、杂环化合物、苯胺、烯烃、炔烃、二醇、氨基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺胺、环氧化物、氮杂环丙烷、异氰酸酯、磺酰氯、重氮化合物，和酰氯。

[0259] 本文公开的任何小分子ActRII拮抗剂(如,GDF11、GDF8、GDF3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E、BMP6、BMP10、ActRIIA和/或ActRIIB的一种或多种的小分子拮抗剂)可与一种或多种额外的ActRII拮抗剂药剂组合,以达到预期效果[如,治疗或预防有需要的患者的眼睛血管疾病;有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野);和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症]。例如,小分子ActRII拮抗剂可与i)一种或多种额外的小分子ActRII拮抗剂,ii)本文公开的一种或多种ActRII拮抗剂抗体;iii)一种或多种ActRII多肽;iv)一种或多种多核苷酸ActRII拮抗剂;v)一种或多种卵泡抑素多肽;和/或vi)一种或多种FLRG多肽联合使用。

#### [0260] E. 拮抗剂多核苷酸

[0261] 在另一种方面,本公开内容涉及拮抗ActRII活性(如,经由Smads 1、2、3、5和8抑制ActRII信号转导)的多核苷酸,或多核苷酸的组合。特别是,本公开内容提供一种单独或与一种或多种额外的支持疗法联合使用多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,以在有需要的患者中治疗或预防眼睛的血管性疾病[如,黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变],提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)有需要的眼睛血管性疾病患者中和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症的方法。

[0262] 在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制GDF11的活性和/或表达(如,转录、翻译、分泌,或其组合)。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制GDF8的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制GDF3的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制BMP6的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制BMP9的活性和/或表达。或者,在其它实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,不抑制BMP9的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制BMP10的活性和/或表达。或者,在其它实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,不抑制BMP10的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C,和激活素

E)的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制激活素B的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,不抑制激活素A的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制激活素B的活性和/或表达,但不抑制激活素A的活性和/或表达。

[0263] 在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合,可被用来抑制GDF11和GDF8的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11和/或GDF8的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合进一步抑制激活素(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C和/或激活素E)的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8和/或激活素的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合还抑制BMP6的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8、激活素和/或BMP6的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合进一步抑制GDF3的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6和/或GDF3的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合进一步抑制BMP10的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8、激活素、BMP6、GDF3和/或BMP10的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合进一步抑制BMP9的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6、GDF3、BMP9和/或BMP10的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合不抑制激活素A的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6、GDF3和/或BMP10的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合不抑制激活素A或BMP9的活性和/或表达。在一些实施方案中,抑制GDF11、GDF8、激活素B、BMP6和/或GDF3的活性和/或表达的多核苷酸ActRII拮抗剂,或多核苷酸ActRII拮抗剂的组合不抑制激活素A、BMP9或BMP10的活性和/或表达。

[0264] 在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸拮抗剂,或多核苷酸拮抗剂的组合抑制ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)的活性和/或表达(如,转录、翻译、分泌,或其组合)。在一些实施方案中,本公开内容的抑制ActRII的活性和/或表达的多核苷酸拮抗剂,或多核苷酸拮抗剂的组合还可抑制配体(如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E、BMP6、BMP9、GDF11、GDF8,和BMP10)的一种或多种的活性和/或表达。在一些实施方案中,本公开内容的抑制ActRII的活性和/或表达的多核苷酸拮抗剂,或多核苷酸拮抗剂的组合不抑制激活素A的活性和/或表达。

[0265] 本公开内容的多核苷酸拮抗剂可以是反义核酸、RNAi分子[如,小干扰RNA(siRNA)、小干扰-发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)]、适配体和/或核酶。人类GDF11、GDF8、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、BMP6、BMP10、ActRIIA和ActRIIB的核酸和氨基酸序列是本领域已知的,因而,根据本公开内容的方法使用的多核苷酸拮抗剂通常可由技术人员基于本领域的知识和本文提高的教导制备。

[0266] 例如,反义技术可被用来通过反义DNA或RNA,或通过三螺旋形成控制基因表达。反义技术例如在Okano(1991)J.Neurochem.56:560;作为基因表达的反义抑制剂的寡脱氧核

昔酸(Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression),CRC Press,Boca Raton,Fla.(1988)中讨论。三螺旋形成在例如,Cooney et al.(1988)Science 241:456;和Dervan et al.,(1991)Science 251:1300中讨论。所述方法是以多核苷酸与互补DNA或RNA的结合为基础。在一些实施方案中,反义核酸包含与所需基因的至少部分RNA转录物互补的单链RNA或DNA序列。然而,绝对互补,虽然是优选的,但并不需要。

[0267] 本文所指的“与至少部分RNA互补”的序列意指具有具有足够的互补性,能够与RNA杂交,形成稳定的双螺旋的序列;在本文公开的基因的双-链反义核酸的情况下,因而可测试双螺旋DNA的单链,或者可分析三螺旋形成。杂交的能力将取决于互补的程度和反义核酸的长度。一般地,杂交核酸越大,它可能包含的RNA的碱基错配就越多并且还形成稳定的双螺旋(或视情况而定可能是三螺旋)。本领域技术人员可通过使用测定杂化配合物的熔点的标准程序确定可容忍的错配程度。

[0268] 与信使的5'端互补的多核苷酸,例如,达到并包括AUG起始密码子的5'-未翻译的序列应最有效地在抑制翻译中发挥作用。然而,与mRNA的3'-未翻译序列互补的序列已显示也有效地抑制mRNA的翻译[见例如,Wagner,R.,(1994)Nature 372:333-335]。因此,与本公开内容的基因的或者5'-或者3'-未翻译的、非编码区互补的寡核苷酸可用于抑制内源性mRNA的翻译的反义途径。与mRNA的5'-未翻译的区互补的多核苷酸应包含AUG起始密码子的补体。与mRNA编码区互补的反义多核苷酸为翻译的较低效力的抑制剂,但可根据本公开内容的方法使用。无论是设计与本公开内容的mRNA的5'-未翻译的、3'-未翻译区,还是与编码区杂交,反义核酸应为至少6个核苷酸长度,且优选寡核苷酸为范围从6至约50个核苷酸的长度。在特定方面,寡核苷酸是至少10个核苷酸,至少17个核苷酸,至少25个核苷酸,或至少50个核苷酸。

[0269] 在一个实施方案中,本公开内容的反义核酸是通过外源序列的转录在细胞内产生的。例如,载体或其部分被转录,生产本公开内容的基因的反义核酸(RNA)。这样一种载体将含有编码所需反义核酸的序列。这样一种载体可保持同分异构体或成为染色体整合,只要它可被转录以生产所需反义RNA。这样的载体可通过本领域的重组DNA技术方法标准构建。载体可以是质粒、病毒,或本领域已知的用于在脊椎动物细胞中复制和表达的其它载体。编码本公开内容的所需基因或其片段的序列的表达,可通过本领域已知的任何启动子在脊椎动物,优选人类细胞中发挥作用。这样的启动子可以是诱导型或组成型。这样的启动子包括,但不限于,SV40早期启动子区[见例如,Benoist和Chambon(1981)Nature 29:304-310]、瘤状肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)的3'长端重复中包含的启动子[见例如,Yamamoto et al.(1980)细胞22:787-797]、疱疹胸苷启动子[见例如,Wagner et al.(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445],和金属硫蛋白基因调控的序列的[见例如,Brinster,et al.(1982)Nature 296:39-42]。

[0270] 在一些实施方案中,多核苷酸拮抗剂是靶向一种或多种基因的表达的干扰RNA或RNAi分子。RNAi指干扰定向mRNA表达的RNA的表达。特别地,RNAi经由与特定mRNA相互作用,通过siRNA(小干扰RNA)使靶基因沉默。然后ds RNA配合物被细胞定向降解。siRNA分子是10-50个核苷酸长度的双-链RNA双螺旋,其干扰为充分互补的(如与所述基因至少80%同一性)的靶基因的表达。在一些实施方案中,siRNA分子包含与靶基因的核苷酸序列至少85、90、95、96、97、98、99或100%相同的核苷酸序列。

[0271] 额外的RNAi分子包括短-发夹RNA(shRNA);即短-干扰发夹和微RNA(miRNA)。shRNA分子包括来自一个环连接的靶基因的有义和反义序列。shRNA从细胞核被输送到细胞质中,并且它与mRNA一起被降解。Pol III或U6启动子可被用来表达RNAi的RNAs。Paddison et al. [Genes&Dev. (2002) 16:948-958, 2002] 已使用折叠成发夹的干扰RNA分子作为影响RNAi的手段。因此,这样的短发夹RNA(shRNA)分子也有利地用于本文描述的方法。茎的长度和功能shRNAs的环可以变化。茎长度可在范围从约25至约30nt的任何处,且环大小可在4-约25nt之间的范围内,而不影响沉默活性。虽然不希望受到任何特殊理论的束缚,相信这些shRNAs类似DICER RNase的双-链RNA(dsRNA)产品,并且在任何情况下,具有相同的抑制特定基因表达的能力。shRNA可从慢病毒载体表达。miRNA是约10-70个核苷酸长度的单链RNA,其最初被转录为以“茎-环(stem-loop)”前-miRNA,并且其随后在通过RISC进一步处理后被处理为成熟的miRNA。

[0272] 介导RNAi的分子(包括非限制的siRNA),可通过在体外化学合成(Hohjoh, FEBS Lett521:195-199, 2002), dsRNA的水解(Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), 通过用T7 RNA聚合酶体外转录(Donzeet et al., Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002), 和通过使用核酸酶如大肠杆菌RNase III水解双-链RNA(Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002)产生。

[0273] 根据另一种方面,本公开内容提供多核苷酸拮抗剂包括但不限于,诱饵DNA(decoy DNA)、双-链DNA、单链DNA、复合DNA、包囊DNA、病毒DNA、质粒DNA、裸RNA、包囊RNA、病毒RNA、双-链RNA、能够生成RNA干扰的分子,或其组合。

[0274] 在一些实施方案中,本公开内容的多核苷酸拮抗剂是适配体。适配体是核酸分子,包括双-链DNA和单链RNA分子,其结合并形成三级结构,后者特异性地结合靶分子,例如GDF11、GDF8、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、BMP6、BMP7、结节、ActRIIA,和ActRIIB多肽。适配体的生成和治疗用途在该技术领域已经确立。见例如,美国专利号5,475,096。有关适配体的更多的信息可在美国专利申请公布号20060148748中发现。使用本领域已知的方法,例如经由配体指数富集的系统演化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (SELEX)方法选择核酸适配体。SELEX是高度特异性结合靶分子的核酸分子的体外演化的方法,如在例如,美国专利号5,475,096、5,580,737、5,567,588、5,707,796、5,763,177、6,011,577和6,699,843中所述。另一种鉴定适配体的筛选方法描述于美国专利号5,270,163中。SELEX方法是以核酸形成多个二维-和三维结构的能力,以及核苷酸单体中可用作配体与几乎任何化学化合物,无论是单体的还是聚合物的,包括其它核酸分子和多肽(形成特异性结合对)的可利用的化学通用性为基础的。任何大小或组成的分子可用作靶。SELEX方法包括从候选寡核苷酸的混合物中选择和结合、分离和扩增的逐步迭代,使用相同的一般选择方案,以实现所需的结合亲和力和选择性。从核酸的混合物(其可包含一段随机序列)开始,SELEX方法包括使该混合物与靶在有利于结合的条件下接触;从已特异性地结合靶分子的那些核酸分离未结合的核酸;缔结核酸-目标配合物;扩增从核酸-目标配合物解离的核酸以产生富含配体的核酸混合物的步骤。通过产生对靶分子的高特异性高亲和力核酸配体所需的许多循环,重复结合、分离、解离和扩增的步骤。

[0275] 通常,这样的结合分子被独立地施用于动物[见例如, O'Connor (1991)]

J.Neurochem.56:560],但这样的结合分子也可由宿主细胞摄取的多核苷酸在体内表达并在体内表达[见例如,作为基因表达的反义抑制剂的寡脱氧核苷酸(Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression),CRC Press, Boca Raton,Fla.(1988)]。

[0276] 本文公开的多核苷酸ActRII拮抗剂的任何一种(如,GDF11、GDF8、GDF3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、激活素E、BMP6、BMP10、ActRIIA和/或ActRIIB的一种或多种的多核苷酸拮抗剂)可与一种或多种额外的ActRII拮抗剂组合以达到预期效果[如,在有需要的患者中治疗或预防眼睛的血管性疾病;在有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症]。例如,本文公开的多核苷酸ActRII拮抗剂可与i)一种或多种额外的多核苷酸ActRII拮抗剂,ii)一种或多种ActRII多肽;iii)一种或多种ActRII拮抗剂抗体;iv)一种或多种小分子ActRII拮抗剂;v)一种或多种卵泡抑素多肽;和/或vi)一种或多种FLRG多肽联合使用。

#### [0277] F. 卵泡抑素和FLRG拮抗剂

[0278] 在其它方面,根据本文公开的方法使用的ActRII拮抗剂(抑制剂)是卵泡抑素或FLRG多肽,其可单独或与一种或多种额外的支持疗法联合使用,以在有需要的患者中治疗或预防眼睛的血管性疾病(如,黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、视网膜静脉闭塞后黄斑水肿,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变);在有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)和/或治疗或预防眼睛的血管性疾病的一种或多种并发症。

[0279] 术语“卵泡抑素多肽”包括包含保持有用活性的卵泡抑素的任何天然存在的多肽以及任何其变体(包括突变体、片段、融合,和拟肽形式)的多肽,并且还包括卵泡抑素的任何功能单体或多聚体。在某些优选的实施方案中,本公开内容的卵泡抑素多肽结合和/或抑制激活素,特别是激活素A的活性。保持激活素结合特性的卵泡抑素多肽的变体可基于先前的涉及卵泡抑素和激活素相互作用的研究来鉴定。例如,WO2008/030367公开了显示对激活素结合是重要的特异性卵泡抑素域(“FSDs”)。如在以下SEQ ID NOs:28-30中所示的,卵泡抑素N-末端域(“FSND”SEQ ID NO:28)、FSD2(SEQ ID NO:30),和在较小的程度上的FSD1(SEQ ID NO:29)代表对激活素结合是重要的卵泡抑素内的示例性结构域。此外,制备和测试多肽库的方法已在上文ActRII多肽的背景下描述,且这样的方法也属于卵泡抑素变体的制备和测试。卵泡抑素多肽包括从任何已知的卵泡抑素的序列衍生的多肽,所述卵泡抑素具有与卵泡抑素多肽的序列至少约80%同一性,且任选至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同一性的序列。卵泡抑素多肽的实例包括成熟的卵泡抑素多肽或人类卵泡抑素前体多肽的较短的同工型或其它变体(SEQ ID NO:26)如例如在WO2005/025601中描述的。

[0280] 人类卵泡抑素前体多肽同工型FST344如下列出：

1 mvrarhqpgg lcllllllcq fmedrsaqag ncwlrqakng rcqvlyktel  
 51 skeeccstgr lstswteedv ndntlfkwmi fnggapncip cketcenvdc  
 101 gpgkkcrmkn knkprvcap dcsnitwkgp vcgldgktyr necallkarc  
 151 keqpelevqy qgrckkterd vfcpgsstev vdqtnnaycv tenricpepa  
 [0281] 201 sseqylegnd gvtysachl rkatcllgrs iglayegkci kakscediqc  
 251 tggkkclwdf kvgrgreslc delcpdsksd epvcasdnat yasecamkea  
 301 acssgvlllev khsgsensis edteeeede dqdysfpiss ilew  
 (SEQ ID NO: 26; NCBI 参考号 NP\_037541.1)

[0282] 信号肽是加下划线的；上面也有下划线的是最后27个残基，其表示区分这种卵泡抑素同工型与下示的较短卵泡抑素同工型FST317的C-末端延伸。

[0283] 人类卵泡抑素前体多肽同工型FST317如下列出：

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL  
 51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC  
 101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC  
 [0284] 151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA  
 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC  
 251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA  
 301 ACSSGVLLEV KHSGSCN (SEQ ID NO: 27; NCBI 参考号 NP\_006341.1)

[0285] 信号肽是有下划线的。

[0286] 卵泡抑素N-末端域(FSND)序列如下列出：

[0287] gncwlrqakngrcqvlyktelskeeccstgrlstswteedvndntlfkwmi fnggapncipck (SEQ ID NO: 28; FSND) FSD1和FSD2序列如下列出：

[0288] etcenvdcgpgkkcrmknknkprcv (SEQ ID NO: 29; FSD1)

[0289] kterdvcpgsstevvdqtnnaycv (SEQ ID NO: 30; FSD2)

[0290] 在其它方面，根据本文公开的方法使用的药物是卵泡抑素-样相关基因 (FLRG)，也称为卵泡抑素-相关蛋白3 (FSTL3)。术语“FLRG多肽”包括包含保持有用活性的FLRG的任何天然存在的多肽以及任何其变体(包括突变体、片段、融合，和拟肽形式)的多肽。在某些优选的实施方案中，本公开内容的FLRG多肽结合和/或抑制激活素，特别是激活素A的活性。保持激活素结合特性的FLRG多肽的变体可使用常规方法鉴定以分析FLRG和激活素相互作用(见例如，US 6,537,966)。此外，制备和测试多肽库的方法在上文ActRII多肽的背景下描述和这样的方法也属于FLRG变体的制备和测试。FLRG多肽包括从任何已知的FLRG序列衍生的多肽，其具有至少约80%同一性与FLRG多肽序列，且任选至少85%、90%、95%、97%、99%或更大同一性的序列。

[0291] 人类FLRG前体(卵泡抑素-相关蛋白3前体)多肽如下列出：

1 mrpgagpplw plpwgalawa vgvssmsgsg npapggvcwl qqqqeatcsl  
 51 vlqtdvtrae ccasgnidta wsnlthpgnk inllgflglv hclpckdscd  
 [0292] 101 gvecgpgkac rmlggrprce capdcsglpa rlqvcgsdga tyrdecelra  
 151 arcrgpdlsl vmyrgrcrks cehvvcprpq scvvdqtgsa hcvvcraapc  
 201 pvpsspgqel cgnnnvtiyis schmrqatcf lgrsigvrha gscagtpeep  
 251 pggesaeeeee nfv (SEQ ID NO: 31; NCBI 参考 No. NP\_005851.1)

[0293] 信号肽是加下划线的。

[0294] 在某些实施方案中, 卵泡抑素多肽和FLRG多肽的功能变体或修饰的形式包括具有至少部分卵泡抑素多肽或FLRG多肽和一种或多种融合域, 例如, 促进多肽的分离、检测、稳定或多聚化的域的融合蛋白。已在上文参考ActRII多肽详细地讨论适合的融合域。在一些实施方案中, 本公开内容的拮抗剂是融合蛋白包含融合于Fc结构域的卵泡抑素多肽的激活素-结合部分。在另一个实施方案中, 本公开内容的拮抗剂是包含融合于Fc结构域的FLRG多肽的激活素结合部分的融合蛋白。

[0295] 本文公开的任何卵泡抑素多肽可与本公开内容的一种或多种额外的ActRII拮抗剂组合以达到预期效果(如, 治疗或预防有需要的患者的眼睛血管疾病; 在有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症)。例如, 卵泡抑素多肽可与i) 一种或多种额外的卵泡抑素多肽, ii) 本文公开的一种或多种ActRII多肽, iii) 一种或多种ActRII拮抗剂抗体; iv) 一种或多种小分子ActRII拮抗剂; v) 一种或多种多核苷酸ActRII拮抗剂; 和/或vi) 一种或多种FLRG多肽联合使用。

[0296] 类似地, 本文公开的任何FLRG多肽可与本公开内容的一种或多种额外的ActRII拮抗剂药剂组合, 以达到预期效果(如, 治疗或预防有需要的患者的眼睛血管疾病; , 在有需要的眼睛血管性疾病患者中提高视力和/或治疗或预防眼睛血管性疾病的一种或多种并发症)。例如, FLRG多肽可与i) 一种或多种额外的FLRG多肽, ii) 本文公开的一种或多种ActRII多肽, iii) 一种或多种ActRII拮抗剂抗体; iv) 一种或多种小分子ActRII拮抗剂; v) 一种或多种多核苷酸ActRII拮抗剂; 和/或vi) 一种或多种卵泡抑素多肽联合使用。

[0297] 3. 筛选分析

[0298] 在某些方面, 本公开内容涉及主题ActRII多肽(如, ActRIIA和ActRIIB多肽和其变体)的用途, 以鉴定为ActRII多肽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选择以在例如在动物模型中评价它们的提高视力的能力。

[0299] 有许多通过靶向ActRII信号传导(如, ActRII信号传导经由Smad 1、2、3、5和8)筛选用于提高视力(如, 提高视觉敏锐度和/或视野)的治疗剂的方法。在某些实施方案中, 可进行化合物的高-通量筛选以鉴定干扰ActRII-介导的对选择的细胞系的作用的药剂。在某些实施方案中, 进行分析筛选和鉴定特异性地抑制或减少ActRII多肽与其结合配偶体, 例如ActRII配体(如, 激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、GDF8、GDF11或BMP10)的结合的化合物。或者, 分析可被用来鉴定提高ActRII多肽与其结合配偶体如ActRII配体的结合的化合物。在进一步的实施方案中, 化合物可通过它们与ActRII多肽相互作用来鉴定。

[0300] 根据本公开内容, 多种分析格式将是足够的, 不过, 在此没有明确描述的那些将会被本领域普通技术人员所理解。如本文描述的, 本发明的测试化合物(药剂)可通过任何组

合化学方法创立。或者,主题化合物可以是在体内或体外合成的天然存在的生物分子。要测试的它们用作组织生长的调节剂的能力的化合物(药剂)可例如,通过细菌、酵母、植物或其它生物体产生(如,天然产品),化学生产(如,小分子,包括拟肽(peptidomimetics)),或经重组生产。本发明涵盖的试验化合物包括非-肽基有机分子、肽、多肽、拟肽、糖、激素,和核酸分子。在某些实施方案中,测试药物是具有少于约2,000道尔顿的分子量的小干扰有机分子。

[0301] 本公开内容的试验化合物可作为单一离散的实体提供,或以更大复杂性的库提供,例如通过组合化学制备。这些库可包含,例如,醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚和其它有机化合物类。提供给测试系统的试验化合物可以呈或者分离的形式或者作为化合物的混合物,特别是在初始筛选步骤中。任选地,化合物可任选地用其它化合物衍生和具有促进化合物分离的衍化基团。衍化基团的非-限制性实例包括生物素、荧光素、洋地黄毒苷、绿色荧光蛋白、同位素、聚组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、光可激活交联剂或任何其组合。

[0302] 在测试化合物和天然提取物库的许多药物-筛选程序中,为在给定的时间段使调查的化合物的数量最大化,高通量分析是合乎需要的。在无细胞系统(例如可用纯化或半纯化蛋白衍化)中执行的分析常常优选作为“初步”筛选,其中它们可以被生成以允许快速发展和相对容易地检测由试验化合物介导的分子靶中的变化。此外,测试化合物的细胞毒性的影响或生物利用度一般可在体外系统中被忽略,相反,分析主要集中在药物对分子靶的影响上,因为可表现为ActRII多肽及其结合配偶体(如,ActRII配体)之间的结合亲和力的变化。

[0303] 只是为了说明,在本公开内容的示例性筛选分析中,使感兴趣的化合物与通常能够结合ActRIIB配体的分离和纯化的ActRIIB多肽接触,在适当时是为了分析的意图。然后向化合物和ActRIIB多肽的混合物中加入含有ActRIIB配体(如,GDF11)的组合物。ActRIIB/ActRIIB-配体配合物的检测和定量提供测定化合物抑制(或促进)ActRIIB多肽及其结合蛋白之间的配合物形成的功效的手段。化合物的功效可通过从使用多种浓度的测试化合物获得的数据生成剂量-反应曲线评价。此外,控制分析也可进行以提供用于比较的基线。例如,在控制分析中,将分离和纯化的ActRIIB配体加入到含有ActRIIB多肽的组合物中,而ActRIIB/ActRIIB配体复合物的形成在测试化合物的不存在下定量。应该理解,一般说来,其中反应物可被混合的次序可以变化,并可同时混合。此外,代替纯化的蛋白,细胞提取物和溶胞产物可被用来实施适合的无细胞分析系统。

[0304] ActRII多肽及其结合蛋白之间的配合物形成可用多种技术检测。例如,配合物形成的调节可使用,例如,可检测标记的蛋白如放射标记的(如, $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 或 $^3\text{H}$ )、荧光标记的(如,FITC),或酶法标记的ActRII多肽和/或其结合蛋白,通过免疫分析,或通过色谱检测定量。

[0305] 在某些实施方案中,本公开内容构思了荧光极化分析和荧光共振能量转移(FRET)分析在或者直接或者间接测量ActRII多肽及其结合蛋白之间的相互作用的程度中的用途。进一步,其它检测模式,例如基于光波导(见例如,PCTPublication WO 96/26432和美国专利号5,677,196)、表面等离子体共振(SPR)、表面电荷传感器,和表面力传感器的那些模式,与本公开内容的许多实施方案相容。

[0306] 而且,本公开内容构思了相互作用捕获分析,也称为“双杂交分析”,在鉴定破坏或增强ActRII多肽及其结合配偶体之间的相互作用的药物中的用途。见例如,美国专利号5,283,317;Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232;Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054;Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924;和Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696)。在特定实施方案中,本公开内容构思了反相双杂交系统鉴定离散ActRII多肽或GDF诱捕剂及其结合蛋白之间的相互作用的化合物(如,小分子或肽)的用途[见例如,Vidal和Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29;Vidal和Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81;和美国专利号5,525,490;5,955,280;和5,965,368]。

[0307] 在某些实施方案中,本化合物通过其与ActRII多肽的相互作用的能力来鉴定。所述化合物和ActRII多肽之间的相互作用可以是共价或非-共价的。例如,这样的相互作用可在蛋白水平,使用体外生物化学方法,包括光交联,放射标记的配体结合,和亲和层析鉴定[见例如,Jakoby WB et al. (1974) Methods in Enzymology 46:1]。在某些情况下,所述化合物可以以基于机械的分析,例如针对结合ActRII多肽的化合物的分析来筛选。这可包括固相或液相结合事件。或者,编码ActRII多肽的基因可用报道基因系统(如, $\beta$ -半乳糖酶、萤光素酶,或绿色荧光蛋白)转染到细胞中并针对库优选通过高通量筛选或对所述库的各个成员进行筛选。其它基于机械的结合分析可已采用;例如,检测自由能的变化结合分析。结合分析可用固定在孔、珠粒或芯片的目标进行或用固定抗体捕获或用毛细管电泳拆分。结合的化合物可通常使用比色终点或荧光或表面等离子体共振检测。

#### [0308] 4. 示例性治疗用途

[0309] 如本文所述的,本申请人已发现ActRII拮抗剂(抑制剂)对提高MDS患者的视力具有令人惊奇的作用。此外,鉴于对MDS-相关的视力损失报道的机制[Han et al. (2015) J Glaucoma (先于纸质印刷的电子文档公布);[Brouzas et al. (2009) Clinical Ophthalmology 3:133-137],本公开内容的数据提示ActRII抑制剂也可在治疗或预防其它类型的眼睛(眼睛)疾病,特别是血管性眼睛疾患包括,例如,那些与缺血和/或血管性功能不全相关的疾患中具有积极作用。

[0310] 眼睛的结构和功能完整性取决于正常的氧和营养素供应。作为代谢最活跃的组织之一,视网膜比身体内的其它组织消耗氧气的速度更快[Cohen et al. (1965) Biochemistry of the Retina. Orlando, Fla: Academic Press Inc; pp.36-50;和erson et al. (1964) Arch Ophthalmol 72:792-795;和Ames A. (1992) Can J Physiol Pharmacol. 70 (Suppl):S158-64]。双循环系统的存在使得视网膜氧合是独一无二的[Osborne et al. (2004) Prog Retin Eye Res. 23:91-147]。光感受器和外层血管丛的大部分从脉络膜毛细血管层间接接受营养,而视网膜内层是由由视网膜中央动脉分支形成的浅表和深部毛细血管丛供应的。已知视网膜的内层显示了对缺氧挑战的最高敏感性[Janáky et al. (2007) Doc Ophthalmol. 114:45-51],而外层视网膜更能抵抗缺氧的压力[Tinjust et al. (2002) Aviat Space Environ Med. 73:1189-94]。

[0311] 许多系统和细胞反应如糖酵解、血管生成、血管舒张和红细胞生成能使生物体对缺氧作出反应[Harris et al. (2002) Nat Rev Cancer. 2:38-47]。许多组织能够在缺氧-缺血条件下诱导保护机制,其通常在发作的数分钟内被诱导,并对限制损伤至关重要的

[Kitagawa et al. (1990) *Brain Res.* 528:21-4]。然而,在长期缺氧的情况下,这些保护性机制通常在缺氧-缺血性损害数小时内受到削弱/损失,导致细胞死亡和组织损伤[Prass et al. (2003) *Stroke.* 34:1981-6]。转录激活剂缺氧-诱导型因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 是细胞O<sub>2</sub>动态平衡的主要调节剂[Iyer et al. (1998) *Genes Dev.* 12:149-62]。已知缺氧诱导许多组织中的HIF-1 $\alpha$ 和其目标基因如血管内皮生长因子(VEGF)和一氧化氮合酶(NOS)。有趣的是,这些因子的过度产生,例如在长时间缺氧期间,与缺氧缺血状态下的细胞死亡有关。此外,谷氨酸和炎症细胞因子的细胞外积聚增加,这在长时间缺氧期间发生,可损伤细胞和组织。已报道HIF-1 $\alpha$ 、VEGF,和NOS的多种同工型在视网膜中的表达在缺氧损伤后增加[Kaur et al. (2006) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:1126-41;和Tezel et al. (2004) *Curr Opin Ophthalmol.* 15:80-4]。

[0312] 视网膜神经节细胞(RGCs)对急性、短暂的,和轻度系统缺氧应激是特别敏感的[Kergoat et al. (2006) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:5423-7]。RGCs的损失发生在许多眼科病症如青光眼和糖尿病中(Sucher et al. (1997) *Vision Res.* 37:3483-93;Abu-El-Asrar et al. (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:2760-6],缺氧与这种损失有关[Wax et al. (2002) *Mol Neurobiol.* 26:45-55;Tezel et al. (2004) *Curr Opin Ophthalmol.* 15:80-4;和Chen et al. (2007) *Stem Cells.* 25:2291-301]。由视网膜缺氧-缺血导致的、由氧和底物剥夺引起的神经元变性,部分地是由游离氧自由基的积累[Block et al. (1997) *Exp Eye Res.* 64:559-64;Muller et al. (1997) *Exp Eye Res.* 64:637-43;和Szabo et al. (1997) *Clin Neurosci.* 4:240-5],谷氨酸兴奋毒性[Kuroiwa et al. (1985) *Acta Neuropathol (Berl)* 68:122-9;Osborne et al. (2004) *Prog Retin Eye Res.* 23:91-147;和Kaur et al. (2006) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:1126-41],炎症,和血液视网膜屏障的破坏介导的[Kuroiwa et al. (1985) *Acta Neuropathol (Berl)* 68:122-9;和Kaur et al. (2007) *J Pathol.* 212:429-39]。

[0313] 缺氧-缺血也导致与细胞外空间(血管性水肿)或细胞内空间(细胞毒性水肿)的流体积聚相关的视网膜血管性损伤[Marmor et al. (1999) *Doc Ophthalmol.* 97:239-49]。内视网膜的细胞外空间由在紧密堆积的细胞元素之间的狭窄缝隙组成。从内视网膜内损伤的毛细血管渗漏的液体积聚在细胞外空间而不是在视网膜细胞元素内,从而破坏正常神经连接的解剖学,导致黄斑水肿[Hamann et al. (2005) *Acta Ophthalmol Scand.* 83:523-5]。黄斑水肿还可加重视网膜缺血以及促进氧化应激和炎症(Guex-Crosier Y. (1999) *Doc Ophthalmol.* 97:297-309;van DamPS. (2002) *Diabetes Metab Res Rev.* 18:176-84;和Miyake et al. (2002) *Surv Ophthalmol.* 47:S203-8.)。已报道导致流体积聚的血液-视网膜屏障(BRB)的渗透性增加归因于由压迫所致的视网膜神经元变性[Antcliff et al. (1999) *Semin Ophthalmol.* 14:223-32;Marumo T et al. (1999) *J Vasc Res.* 36:510-15;和Reichenbach et al. (2007) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 245:627-36]。虽然最初是保护性的,在缺氧-缺血性损害期间VEGF、一氧化氮(NO),和水孔蛋白-4(aquaporin-4)的过度或/或慢性产生可造成内视网膜内BRB的新血管化和功能障碍,导致血清渗漏到视网膜组织并使视网膜水肿。除了血管性渗透性增加外,眼睛缺氧也与内皮细胞死亡、血管的白细胞堵塞,和微动脉瘤有关[Linsenmeier et al. (1998) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:1647-57]。

[0314] 缺氧-缺血发生于多种眼睛病症包括,例如,视网膜动脉/静脉闭塞或血栓形成、眼睛缺血性综合征、缺血性视神经病变,和视网膜缺血中。缺氧-缺血也与青光眼的发展有关 [Flammer J. (1994) 'Surv Ophthalmol.38 (Suppl) :S3-6; Chung et al. (1999) Surv Ophthalmol.43 (Suppl 1) :S43-50; 和 Tezel et al. (2004) Curr Opin Ophthalmol.15:80-4], 被认为是糖尿病性眼睛疾病包括视网膜和视神经头新血管化 [Linsenmeier et al. (1998) Invest Ophthalmol Vis Sci.39:1647-57] 的许多危及视力的并发症的基础,和可在年龄相关的黄斑变性 [Tso et al. (1982) Ophthalmology.89:902-15; Yanoff et al. (1984) Surv Ophthalmol.28 (Suppl) :505-11; 和 Bressler et al. (2001) In: Schachat AP, editor. Retina. St. Louis, MO: Mosby] 中起作用。眼睛缺氧的系统性原因包括新血管性作用、慢性阻塞性气道疾病、动脉/静脉阻塞性病症 [Brown et al. (1988) Int Ophthalmol.11:239-51]、Takayasu's 动脉炎 [Shelhamer et al. (1985) Ann Intern Med.103:121-6]、高粘度综合征 [Ashton et al. (1963) J Pathol Bacteriol.86:453-61] 以及外伤 (如, 手术或事故损伤) [Purtscher's retinopathy; Buckley et al. (1996) Postgrad Med J.72:409-12]。与以上病症相关的缺氧是造成视力障碍和失明的常见原因 [Osborne, et al. (2004) Prog Retin Eye Res.23:91-147]。

[0315] 因此,在某些方面,本公开内容提供在有需要的患者(个体)(特别是哺乳动物如啮齿动物、牛、狗、灵长类动物,和人类)中治疗或预防眼睛的血管性疾病(疾病)的方法,以及组合物,所述方法包括通过施用给所述患者治疗有效量的ActRII拮抗剂(抑制剂),或ActRII拮抗剂的组合。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,治疗或预防与缺血相关的眼睛的血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防缺血性眼睛疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防与微血管功能不全相关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防眼睛微血管功能不全疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防与视网膜病变相关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防与视神经病变相关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防缺血性视网膜病变的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防缺血性视神经病变的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防与微血管功能不全相关的视网膜病变的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防与微血管功能不全相关的视神经病变的方法。特别是,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防一种或多种选自以下疾病的方法:黄斑变性(如,年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视

神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变。在一些实施方案中,本文公开的用于治疗眼睛疾病的方法和组合物导致提高所述患者眼睛的视力。在一些实施方案中,本文公开的用于治疗眼睛疾病的方法和组合物导致提高所述患者眼睛的视力。在一些实施方案中,本文公开的用于治疗眼睛疾病的方法和组合物导致增加所述患者眼睛的视野。任选地,本公开内容的用于治疗或预防眼睛的血管性疾病的方法除了施用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合[如,手术、激光疗法(如,光凝固)、抗-血管生成疗法[如,VEGF抑制剂如贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>),和阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)]、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761)、抗炎药、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、眼睛过滤手术、引流阀植入、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素)、类固醇、全身性或局部性皮质类固醇(如,泼尼松曲安西龙(Triesence<sup>®</sup>),和地塞米松(Ozurdex<sup>®</sup>)、不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)、膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术,和充气性视网膜固定术]外,还可包括施用一或多种治疗或预防疾病的支持疗法。

[0316] 在某些方面,本公开内容提供通过施用于所述患者治疗有效量的ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,治疗或预防患者的眼睛血管性疾病的方法,以及组合物,所述眼睛血管性疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患者中治疗或预防与眼睛缺血相关的眼睛血管性疾病的方法,所述眼睛血管性疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防患者的缺血性眼睛疾病的方法,所述缺血性眼睛疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合在患者中治疗或预防与微血管功能不全相关的眼睛血管性疾病的方法,所述眼睛血管性疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防患者的眼睛微血管功能不全疾病的方法,所述眼睛微血管功能不全疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防与患者的视网膜病变相关的眼睛血管性疾病的方法,所述眼睛血管性疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合在患者中治疗或预防与视神经病变相关的眼

睛血管性疾病的方法,所述眼睛血管性疾病为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防缺血性患者的视网膜病变的方法,所述视网膜病变为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗或预防患者的缺血性视神经病变的方法,所述缺血性视神经病变为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合在患者中治疗或预防与微血管功能不全相关的视网膜病变的方法,所述视网膜病变为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合在患者中治疗或预防与微血管功能不全相关的视神经病变的方法,所述视神经病变为以下的一种或多种:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本文公开的在患有以下的一种或多种疾病的患者中治疗眼睛疾病的方法和组合物导致提高所述患者眼睛的视力:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本文公开的在患有以下的一种或多种疾病的患者中治疗眼睛血管性疾病的方法和组合物导致提高所述患者眼睛的视力:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。在一些实施方案中,本文公开的在患有以下的一种或多种疾病的患者中治疗眼睛血管性疾病的方法和组合物导致增加所述患者眼睛的视野:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病。任选地,本公开内容的在患有以下的一种或多种疾病的患者中治疗或预防眼睛疾病的方法:贫血、骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、血红蛋白病、地中海贫血,和镰状细胞病,除了施用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,还可包括施用一或多种治疗或预防眼睛的血管疾病的支持疗法。

[0317] 在某些方面,本公开内容提供通过施用于所述患者治疗有效量的ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,治疗或预防患有骨髓增生异常综合征患者(个体)(特别是哺乳动物如啮齿动物、牛、狗、灵长类动物,和人类)的眼睛血管性疾病的方法和组合物。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防与眼睛缺血相关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防缺血性眼睛疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防与微血管功能不全相关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防眼睛微血管功能不全疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防与视网膜病变相关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防与视神经病变相

关的眼睛血管性疾病的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防患者的缺血性视网膜病变的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防缺血性视神经病变的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防与微血管功能不全相关的视网膜病变的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中治疗或预防与微血管功能不全相关的视神经病变的方法。在一些实施方案中,本文公开的治疗骨髓增生异常综合征患者的眼睛血管性疾病的方法和组合物导致提高所述患者眼睛的视力。在一些实施方案中,本文公开的治疗骨髓增生异常综合征患者的眼睛血管性疾病的方法和组合物导致提高所述患者眼睛的视力。在一些实施方案中,本文公开的治疗骨髓增生异常综合征患者的眼睛血管性疾病方法和组合物导致增加所述患者眼睛的视野。任选地,本公开内容的治疗或预防骨髓增生异常综合征患者的眼睛血管性疾病的方法除了施用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可包括施用治疗或预防眼睛疾病的一种或多种支持疗法。

[0318] 在某些方面,本公开内容通过施用于所述患者治疗有效量的ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,提供提高有需要的患者的视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法和组合物。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有眼睛血管性疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有与缺血性眼睛疾病相关的眼睛血管性疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有与微血管功能不全相关的眼睛血管性疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有与眼睛微血管功能不全疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有与视网膜病变相关的眼睛血管性疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在与视神经病变相关的眼睛血管性疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有缺血性视网膜病变的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有缺血性视神经病变的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有与微血管功能不全相关的视网膜病变的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有与微血管功能不全相关的视神经病变的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。特别是,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有选自以下的一或多种疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法:黄斑变性(如,

年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、湿黄斑变性、干黄斑变性、斯塔加特氏病,和贝斯特氏病)、视网膜静脉闭塞(如,视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞,和缺血性视网膜静脉闭塞)、视网膜动脉闭塞(如,视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞,和缺血性视网膜动脉闭塞)、糖尿病性视网膜病变、缺血性视神经病变[如,前缺血性视神经病变(动脉的和非-动脉的)和后缺血性视神经病变]、黄斑毛细血管扩张症(I型或II型)、视网膜缺血(如,急性视网膜缺血或慢性视网膜缺血)、眼睛缺血性综合征、视网膜血管炎,和早产儿视网膜病变。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在贫血患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有骨髓增生异常综合征的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有铁粒幼细胞性贫血的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有血红蛋白病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有地中海贫血的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供使用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,在患有镰状细胞病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法。任选地,本公开内容在患有眼睛疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)的方法,除了施用ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可包括施用一或多种治疗或预防眼睛疾病的支持疗法。

[0319] 如本文所用的,“预防”疾病或病症的治疗剂指在统计的样本中,在处理的样本中相对于未处理的对照样本减少疾病或病症的发生,或相对于未处理的对照样本,延缓疾病或病症的一种或多种症状的发作或减少疾病或病症的一种或多种症状的严重程度的化合物。

[0320] 如本文所用的术语“治疗”包括一旦病症已经确立,改善或消除病症。在任一种情况下,可在由医生或其他卫生保健提供者提供的诊断中辨别预防或治疗以及施用治疗剂的预期结果。

[0321] 一般来说本公开内容中描述的疾病或病症的治疗或预防通过施用有效量的一种或多种ActRII拮抗剂(如,ActRIIA和/或ActRIIB拮抗剂)实现。有效量的药物指按剂量和所需时间段计算的实现所需治疗或预防结果的有效量。治疗有效量的本公开内容的药物可根据诸如个体的病情、年龄、性别和体重,和在个体中引起所需反应的药物的效能的因素而变化。治疗有效量指按剂量和所需时间段计算的实现所需预防结果有效量的。

[0322] 眼睛损伤是骨髓增生异常综合征的并发症/临床表现 [Han et al. (2015) J Glaucoma (先于纸质印刷的电子文档公布); [Brouzas et al. (2009) Clinical Ophthalmology 3:133-137]。本申请人已经发现用ActRII抑制剂治疗对提高MDS患者的视力具有令人惊奇的作用。考察MDS患者的视力损失的机制提示,ActRII抑制剂疗法也可用于治疗其它眼睛的血管性疾病,特别是与缺血和/或微血管功能不全相关的那些。例如,除了MDS,其它血液学疾病与眼睛损伤相关,包括,例如,血红蛋白病疾病(如,镰状细胞疾病和地中海贫血) [de Melo M.B. (2014) Rev Hematol Hemoter 36(5):319-321;和Aksoy et al.

(2013)Seminars in Ophthalmology 28(1):22-26]。

[0323] 因此,在某些方面,本公开内容提供在患有血液疾病的患者中提高视力(如,视觉敏锐度和/或视野)的方法和组合物,所述方法是施用一种或多种ActRII拮抗剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂等等)。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在贫血患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在MDS患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在血红蛋白病患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在地中海贫血患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在镰状细胞疾病患者提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在铁粒幼细胞性贫血患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。任选地,患有血液学疾病(如,骨髓增生异常综合征、铁粒幼细胞性贫血、地中海贫血、镰状细胞疾病,贫血、血红蛋白病,或铁粒幼细胞性贫血)和需要改进的视力(改进的视觉敏锐度和/或视野)的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一或多种治疗血液学疾病的支持疗法治疗。

[0324] 视网膜缺血是常见疾病,由于相对无效的治疗,仍然是工业化国家视力障碍和失明的常见原因[Osborne et al. (2004)Progress in Retinal and Eye Research 23:91-147]。缺血指涉及流向组织的血液不足(并不一定完全缺乏),不能满足细胞能量需求的病理状况。一般来说,缺血剥夺了组织的三个要求:氧、代谢底物,和和废物去除。这些要求的丧失开始会降低稳态反应并随着时间的推移会导致对组织的损伤。如果保留足够长的时间,组织将死亡(一种梗死)。在细胞水平,缺血性视网膜损伤由涉及神经元去极化的自我强化破坏性级联、钙流入,和由能量衰竭和谷氨酸刺激增加引起的氧化应激组成。最终缺血性损伤可导致视网膜内的细胞损失,包括,例如,感光细胞、神经节细胞和无长突细胞。

[0325] 视网膜缺血可由多种病症包括,例如,中风、眼睛损伤,和糖尿病引起。当视网膜中央静脉闭塞或从眼睛剥离时,通常也会引起这种情况。当视网膜失去其氧供时,人体试图通过生产各种血管修饰剂来进行补偿,包括,例如,血管内皮生长因子(VEGF)。不幸的是,这可导致视网膜表面上的异常血管生长,导致失明。事实上,已提出缺血是造成患有视网膜静脉闭塞、糖尿病、镰状-细胞视网膜病变,和早产儿视网膜病变的患者视网膜新生血管形成的原因,其全部可最终导致视网膜血管出血和/或视网膜剥离[Osborne et al. (2004)Progress inRetinal and Eye Research 23:91-147]。

[0326] 视网膜缺血可表现为慢性或急性疾病。一般说来,视网膜缺血首先定位于一只眼睛,但随着时间的推移它常常发展而影响到两只眼睛。在大多数情况下,视网膜缺血患者出现无痛视力丧失和视盘肿胀有关的视野。患有这种病症的患者的年龄范围是宽泛的,且部分地取决于缺血的原因。然而,一些患者,只是经历突然的视觉丧失。视觉丧失的程度可能是严重的或者患者可能只注意到视力模糊的感觉,常常描述为在视野的一部分上的阴影或被蒙上面纱。视力丧失的情况各不相同,并且可能造成严重的视野和视力损害。一旦出现,视力丧失通常是永久的,虽然在早期阶段采用适当的治疗时,某种程度的恢复是可能的。

[0327] 有多种眼睛和系统治疗可用来治疗视网膜缺血,许多具有有限的效果和/或潜在

的副作用。这些治疗包括,例如:手术、激光疗法(如,光凝固)、抗凝血剂(如,阿司匹林和PAF抑制剂)、抗-血管生成疗法(如,VEGF抑制剂)、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761),和抗炎药。

[0328] 在某些方面,本公开内容提供用于治疗或预防有需要的患者的视网膜缺血的方法,以及组合物,所述方法包括施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)]。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防以下的一种或多种:急性视网膜缺血和慢性视网膜缺血。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防选自以下的一种或多种视网膜缺血并发症:白内障、角膜水肿、眼张力过低、眼压升高、前房炎、新生血管性青光眼,和虹膜新血管化、视网膜动脉狭窄、视网膜静脉扩张、视网膜出血、棉絮状渗出点(cotton-wool spots)、樱桃红斑点(cherry-red spot)、视神经新血管化、视网膜新血管化、缺血性眼睛疼痛,和一时性黑蒙。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来提高视网膜缺血患者的视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。任选地,罹患视网膜缺血的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗外,还可用一种或多种治疗视网膜缺血的支持疗法[如,手术、激光疗法(如,光凝固)、降低眼内压的局部药物治疗、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、玻璃体内类固醇、眼睛过滤手术、青光眼引流阀植入治疗新生血管性青光眼、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素),和全身性类固醇疗法、抗-血管生成疗法(如,VEGF抑制剂)、Ca<sup>2+</sup>抑制剂(如,氟桂利嗪和硝苯地平)、冷冻疗法、高压给氧、Na<sup>+</sup>通道阻滞剂(如,托吡酯)、iGluR拮抗剂(如,MK-801、右美沙芬、依利罗地,和氟吡汀)、抗氧化剂(如,二甲基硫脲、维生素E、 $\alpha$ -硫辛酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、去铁敏、甘露醇、别嘌醇、羟苯磺酸钙、氟吡汀、曲美他嗪,和EGB-761),和抗炎药]治疗。

[0329] 眼睛缺血性综合征(OIS)是罕见疾病,其中慢性血管性功能不全导致视力的逐渐或突然丧失[Brown et al (1994)眼睛缺血性综合征(Ocular ischemic syndrome). In: Retina. 第二版. Mosby. 1515-27; 和Chen et al. (2007) Compr Ophthalmol Update. 8(1): 17-28]。OIS的最常见的病因是颈内动脉或颈总动脉分叉处的明显狭窄的分离的单侧或双侧动脉粥样硬化。OIS也可由巨细胞动脉炎引起。推测血管性灌注的减少导致组织缺氧和眼睛缺血增加,这通常导致新血管化。该病最常见于具有心血管性疾病的其它危险因素,例如糖尿病、高脂血症和高血压的患者中。通常前房病变包括白内障、角膜水肿、眼张力过低、眼压升高、前房炎、新生血管性青光眼,和虹膜新血管化。后区段体征包括视网膜动脉狭窄、扩张,但非扭曲视网膜静脉、视网膜出血、棉絮状渗出点、樱桃红斑点,和视神经/视网膜新血管化。

[0330] OIS的主要的症状包括视觉损失,光引起的短暂视觉损失、一时性黑蒙,和缺血性眼睛疼痛[Mizener et al. (1997) Ophthalmology. 104(5): 859-64; 和Chen et al. (2007) Compr Ophthalmol Update. 8(1): 17-28]。视力的损失是最常遇见的症状,存在于70-90%的患者中。而视觉损失通常是在几周几个月的时间里逐渐发生的,它也可能突然发生。约40%的OIS患者将存在缺血性疼痛的症状。一般说来,疼痛被特征地描述为眉毛上的隐痛,

其在数小时到数日的时间里逐渐开始。一时性黑蒙是完全或部分单眼失明的短暂发作,持续少于约10分钟的时间。一时性黑蒙的病史被发现于约9-15%的OIS患者中。

[0331] 有多种眼睛和系统治疗可用来治疗OIS,许多具有有限的效果和/或潜在的不利副作用。眼睛治疗包括,例如:手术或激光疗法(如,泛视网膜光凝固)以治疗虹膜的新血管化、视神经,或视网膜;降低眼内压的局部药物治疗、睫状体透热凝固术和睫状体冷冻疗法以降低眼内压;玻璃体内类固醇;和眼睛过滤手术和青光眼引流阀植入治疗新生血管性青光眼。系统治疗包括,例如:抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素),和类固醇。

[0332] 在某些方面,本公开内容提供用于治疗或预防有需要的患者的眼睛缺血性综合征的方法,以及组合物,所述治疗包括施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)]。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防选自以下的眼睛缺血性综合征的一种或多种并发症:白内障、角膜水肿、眼张力过低、眼压升高、前房炎、新生血管性青光眼,和虹膜新血管化、视网膜动脉狭窄、视网膜静脉扩张、视网膜出血、棉絮状渗出点、樱桃红斑点、视神经新血管化,视网膜新血管化、缺血性眼睛疼痛,和一时性黑蒙。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在患有眼睛缺血性综合征的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野)。任选地,罹患眼睛缺血性综合征的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合治疗外,还可用一种或多种治疗眼睛缺血性综合征的支持疗法[如,泛视网膜光凝固,降低眼内压的局部药物治疗、睫状体透热凝固术、睫状体冷冻疗法、玻璃体内类固醇、眼睛过滤手术、青光眼引流阀植入治疗新生血管性青光眼、抗血小板疗法(如,阿司匹林、噻氯匹定,和氯吡格雷)、抗凝疗法(如,华法林和肝素),和全身性类固醇疗法]治疗。

[0333] 缺血性视神经病变(ION)是由于眼球视神经的血流减少或中断而突然失去中央视觉,侧视觉,或两者兼而有之。有两个主要类别的ION:后缺血性视神经病变(PION)和前缺血性视神经病变(AION)。AION一般被分类为或者动脉的AION(AAION)或者非-动脉的AION(NAION)。

[0334] PION一般特征是视神经后神经部分因缺血而受损。尽管有术语后房,这种病理生理学可以应用于缺血损伤在前房的病例中,因为该病症描述了一种特殊的视觉损失机制和视神经损伤的位置。AION以这样的事实来区分,即它在有诱发疾病和/或心血管危险因素的患者中自发和单方面发生。PION通常发生于两类患者:i)已经历特别是延长或与大量失血相关的非-眼睛手术的患者,和ii)曾因意外或血管破裂而出现严重出血的患者。具有高血压、糖尿病,和吸烟的历史的患者对PION是最易感的,因为它们一般具有受损的血管自动调节。

[0335] AAION由颞动脉炎(也称为巨细胞动脉炎)产生,其是一般发生于老年人的中等大小的血管的炎性疾病。大多数AAION病例导致一只眼睛几乎完全失明。如果不进行治疗,第二只眼睛可能也会在1-2周内失明。与此相反,NAION在年龄稍轻的人群中更常见并由具有常常被称为“拥挤盘”或“面临危险的盘”的一种类型的视盘形状的患者中的心血管危险因素(如,糖尿病、高血压,和高胆固醇水平)的一致性产生。

[0336] 一度有人认为ION损伤可能不会逆转。然而,最近的研究已显示,在ION的早期阶段,用大剂量皮质类固醇(如,泼尼松)治疗的患者提供视力[Hayreh et al. (2008) Graefe'

sArchive for Clinical Experimental Ophthalmology 246(7):1029-1046]。

[0337] 在某些方面,本公开内容提供在有需要的患者中治疗或预防缺血性视神经病变的方法和组合物,所述方法包括施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)]。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防以下的一种或多种:后缺血性视神经病、前缺血性视神经病、动脉的前缺血性视神经病变,和非-动脉的前缺血性视神经病变。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在患有以下的一种或多种疾病的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或视野):后缺血性视神经病、前缺血性视神经病、动脉的前缺血性视神经病变,和非-动脉的前缺血性视神经病变。任选地,罹患缺血性视神经病变的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一种或多种治疗缺血性视神经病变的支持疗法治疗[如,皮质类固醇(泼尼松)]。

[0338] 视网膜血管炎可以是独立的病症或以视网膜脉管炎症为特征的局部或系统性疾病的并发症[Walton et al.(2003)Current opinion in ophthalmology.14(6):413-419;和Ali et al.(2014)The Britishjournal ofophthalmology.98(6):785-789]。视网膜血管炎根据位置一般分类大血管炎、中血管炎、小血管炎、可变化血管炎,和单器官血管炎。视网膜血管炎的典型的特征存在围绕血管壁的鞘。血管周鞘是由围绕受影响的血管的炎性细胞组成的渗出物的集合。这导致在血管周围出现白色卡夫状物(white cuff)。视网膜炎的斑点可伴有视网膜血管炎。这些被发现于患有 Adamantiades-Behçet' s病和传染性葡萄膜炎的个体中。视网膜炎可能是短暂的或可伴有视网膜坏死。视网膜内浸润可能危及视力,并可能导致视网膜萎缩、破裂,和剥离。视网膜血管炎可导致视网膜神经纤维层的微梗死,其在视网膜浅表面上表现为弥漫的、蓬松的,像棉花一样的斑点。与视网膜血管炎相关的传染形式的眼色素层炎可能与视网膜层坏死相关。霜样树枝状视网膜血管炎(Frosted branch angiitis)是淋巴浆细胞性浸润对血管周围空间的严重浸润为特征的视网膜血管炎。这给出一种树枝结霜的外观。继发于炎症的视网膜血管的阻塞可导致视网膜缺血和毛细血管非灌注区发育。这些患者可能更倾向于出现视网膜非-灌注引起的并发症,例如新血管化和眼内出血。这可导致视网膜非-灌注的一个重要区域发展。可能导致的多种其它并发症包括虹膜发红、牵拉性视网膜剥离、新生血管性青光眼,和复发性玻璃体出血。

[0339] 非-传染视网膜血管炎通过全身或局部皮质类固醇(如,泼尼松和曲安西龙)和不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)处理。治疗剂的局部递送可经由玻璃体内注射或眼周疗法除了免疫抑制外,还有各种治疗方法,如手术根据眼睛的临床表现,病因和系统的共同疾病进行调整。除了免疫抑制外,多种治疗选项如手术、冷冻疗法,和激光疗法(如,泛-视网膜光凝固)可被用来控制视网膜血管炎。

[0340] 在某些方面,本公开内容提供在有需要的患者中治疗或预防视网膜血管炎的方法和组合物,所述方法包括施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)]。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防以下的一种或多种:大血管炎、中血管炎、小血管炎、可变化血管炎,和单器官血管炎。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防视网膜血管炎的一种或多种并发症,其选自:血管周鞘、视网膜炎、视网膜坏死、视网膜内浸润霜样树枝

状毛细血管非-灌注、新血管化、眼内出血、虹膜发红,视网膜剥离、新生血管性青光眼,和复发性玻璃体出血。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在患有视网膜血管炎(如,大血管炎、中血管炎、小血管炎、可变化血管炎,和单器官血管炎)的患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野)。任选地,罹患视网膜血管炎的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一种或多种治疗视网膜血管炎的支持疗法[如,皮质类固醇(如,泼尼松和曲安西龙)和不含类固醇的免疫抑制剂(如,环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、英夫利昔单抗和依那西普)]治疗。

[0341] 黄斑变性导致视野中心(黄斑)的视力损失且一般由视网膜的损伤引起[de Jong PT(2006)NEnglJMed255(14):1474-1485]。它是失明和视力损失的主要原因且通常发生在老年人中,全球累及约20,000,000-50,000,000人。因为它主要表现在老年人中,黄斑变性通常被称为年龄相关的黄斑变性。在年青患者中,黄斑变性通常被称为青少年黄斑变性,其一般是潜在的遗传障碍的结果(如,斯塔加特氏病或贝斯特氏病)[Dryja et al.(1998)Science279(5354):1107]。一般来说,黄斑变性表现为或者“干”(非-渗出性)或“湿”(渗出性)疾病。在干黄斑变性中,黄色沉积(脉络膜小疣)聚集在视网膜色素上皮和下脉络膜之间的黄斑部。大的和/或许多的脉络膜小疣沉积会破坏黄斑下的色素细胞层,这可能因受损的光感受器(视锥和视杆)而导致视力丧失。一般来说,湿黄斑变性因从脉络膜毛细血管层通过布鲁赫膜(Bruch's membrane)的异常血管生长(脉络膜新血管化)而产生。这些新血管是脆弱的,导致黄斑下面的血液和蛋白质渗漏。这些血管的出血和瘢痕会损害光感受器,因而促进视力丧失。

[0342] 不幸的是,干黄斑变性的治疗方法有限。然而,大的科学研究(年龄相关的眼睛疾病研究2)显示,在面临发展晚期黄斑变性的高风险人群中,摄取维生素C、维生素E、叶黄素,和玉米黄质与锌组合的膳食补充剂降低至少25%的人群发展至疾病晚期[Chew et al.(2013)Ophthalmology 120(8):1604-1611]。在女性中进行的另一项大型研究显示了摄入叶酸和维生素B6和B12的益处[Christen et al.(2009)Arch Intern Med 169(4):335-341]。其它研究显示叶黄素和玉米黄质可减少发展干黄斑变性的风险[Chew et al.(2013)Ophthalmology131(7):843-850]。

[0343] 对于湿黄斑变性的最常见的疗法是施用一种或多种血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂(抑制剂),包括,例如贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普。贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>)是人源化单克隆VEGF-A抗体。类似地,雷珠单抗(Lucentis<sup>®</sup>)是单克隆VEGF-A抗体片段(Fab)。阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>)是包含来自人类VEGF受体1和2的细胞外结构域部分的免疫球蛋白Fc融合蛋白。虽然大多数病例用药物治疗,手术或激光疗法也可被用来治疗湿黄斑变性。在激光疗法中,一种聚焦光束被用来破坏视网膜中的异常血管,防止进一步的异常血管性生长和渗漏。在一些情况下,湿黄斑变性可用光动力学疗法治疗(photodynamic therapy),其使用光-激活的药物(光敏剂)和低功率激光的组合。将光敏药物注射到所述患者体内并在全身传播,包括眼睛后面的异常脉管。低功率激光直接瞄准异常脉管以激活药物,从而专门破坏不需要的血管。

[0344] 在某些方面,本公开内容通过施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)],提供用于治疗或预防有需要的患者的黄斑变性的方法和组合物。在

一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防以下的一种或多种疾病:年龄相关的黄斑变性、青少年黄斑变性、斯塔加特氏病,贝斯特氏病,干黄斑变性,和湿黄斑变性。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防黄斑变性的一种或多种并发症,包括,例如,糊状沉积(druse deposition)/积聚、黄斑水肿,和新血管化。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来在黄斑变性患者中提高视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野)。任选地,罹患黄斑变性的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一种或多种治疗黄斑变性的支持疗法[如,VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普)、手术、激光疗法、光动力学疗法和/或膳食补充剂(如,维生素C、维生素E、叶黄素、玉米黄质、锌、叶酸、维生素B6、维生素B12,和玉米黄质)]治疗。

[0345] 糖尿病性视网膜病变是糖尿病的眼睛表现并分类为两个类型:非-增殖性糖尿病性视网膜病变(NPDR)和增殖性糖尿病性视网膜病变(PDR)[Semeraro et al. (2015) *Journal of Diabetes Research* 2015 (582060) 1-16; Arden et al. (2011) *Current Diabetes Reviews* 7:291-304; 和Eshaq et al. (2014) *Redox Biology* 2:661-666]。NPDR一般是具有轻微的,或根本不存在的症状的疾病的早期阶段。在NPDR中,视网膜中的血管变弱,导致微动脉瘤。这些微动脉瘤可使流体渗漏到视网膜内,这可导致黄斑水肿。因此,NPDR并发症常常表现为微动脉瘤、视网膜出血、黄斑水肿和黄斑缺血。PDR是该疾病的更晚期形式。在这个阶段,循环问题引起视网膜变得缺氧,这促进视网膜内可延伸进入玻璃体的新的、脆弱的血管形成。这种新血管化可导致玻璃体出血,其可使视力模糊。PDR的其它并发症包括由于结缔组织形成和青光眼发展所致的视网膜剥离。在一些情况下,眼内流体压力的增加导致视神经损伤。如果不加以治疗,糖尿病性视网膜病变可造成重度视力损失和甚至失明。

[0346] 糖尿病性视网膜病变的治疗一般是通过监测患者和治疗并发症如黄斑水肿和新血管化保持视力。糖尿病性视网膜病变的这样的并发症可例如,通过施用VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普)和/或皮质类固醇(如,曲安西龙和地塞米松)治疗。在一些情况下,糖尿病性视网膜病变用手术、激光疗法(如,激光光凝固、改良格栅激光光凝固、泛视网膜光凝固,和光动力学疗法)和/或玻璃体切割术治疗。

[0347] 在某些方面,本公开内容提供通过施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)],在有需要的患者中治疗或预防糖尿病性视网膜病变的方法和组合物。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防以下的一种或多种:非-增殖性糖尿病性视网膜病变和增殖性糖尿病性视网膜病变。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防糖尿病性视网膜病变的一种或多种并发症包括,例如,微动脉瘤,视网膜出血、黄斑水肿、黄斑缺血、新血管化、青光眼、玻璃体出血、视神经损伤,和视网膜剥离。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来提高糖尿病性视网膜病变患者的视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野)。任选地,罹患糖尿病性视网膜病变的患者,除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一种或多种治疗糖尿病性视网膜病变的支持疗法[如,VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普)、皮质类固醇(曲安西龙和地塞米松)、手术、激光疗法(如,激光光凝固、改良格栅激光光凝固、泛视网膜光凝固,和光动力学疗法)和/或玻璃体

切割术]治疗。

[0348] 视网膜闭塞通常为视网膜的血管性疾病且是全世界视力损失的最常见原因之一 [Klein et al. (2000) *Tran Am Ophthalmol Soc.* 98:133-141]。视网膜闭塞可表现为视网膜动脉闭塞 (RAC) 或表现为视网膜静脉闭塞 (RVO)。视网膜闭塞根据闭塞的位置分类。中心静脉在视神经水平的闭塞被称为中央动脉/视网膜静脉闭塞 (CRAO 和 CRVO)。涉及大约一半视网膜的主要上部分支或主要下部分支的闭塞被称为半-视网膜动脉/视网膜静脉闭塞 (HRAO 和 HRVO)。在视网膜的任何更远端的分支处的堵塞被称为分支视网膜动脉/视网膜静脉闭塞 (BRAO 和 BRVO)。闭塞的位置影响视网膜闭塞的发病机制、临床表现及治疗。根据观察到的视网膜毛细血管缺血量, 视网膜闭塞被进一步进一步细分为非缺血型和缺血型。

[0349] 一般来说, 视网膜闭塞是供应血液 (RAC) 或从视网膜排出血液 (RVO) 的循环的部分堵塞。有了堵塞, 毛细血管的压力就会增加, 导致流体和血液的出血和渗漏。这可造成黄斑水肿。黄斑缺血也可在这些毛细血管内发生, 其供应氧至视网膜。氧和营养素可用性的减少促进新血管化, 这可导致新生血管性青光眼、玻璃体出血、视网膜剥离。视觉疾病和失明通常是由这些因素的组合造成的。

[0350] 治疗视网膜闭塞一般是通过监测患者和治疗并发症如黄斑水肿和新血管化保持视力。这样的并发症可用 VEGF 拮抗剂 (如, 贝伐单抗、雷珠单抗, 和阿柏西普) 和/或皮质类固醇包括, 例如, 曲安西龙 (Triescence<sup>®</sup>) 和地塞米松 (Ozurdex<sup>®</sup>) 治疗。在一些情况下, 视网膜闭塞用手术或激光疗法, 包括某些类型的光动力学疗法技术治疗。在难治疗的病例中, 玻璃体切割术可能是需要的, 其包括去除玻璃体并用盐水溶液代替。

[0351] 在某些方面, 本公开内容提供通过施用一种或多种 ActRII 拮抗剂 [如, ActRII 多肽或其变体 (如, GDF 诱捕剂)], 在有需要的患者中治疗或预防视网膜闭塞的方法和组合物。在一些实施方案中, ActRII 拮抗剂, 或 ActRII 拮抗剂的组合, 可被用来治疗或预防以下的一种或多种: 视网膜中央静脉闭塞、半-视网膜静脉闭塞、视网膜分支静脉闭塞、缺血性视网膜静脉闭塞、非-缺血性视网膜静脉闭塞、视网膜中央动脉闭塞、半-视网膜动脉闭塞、视网膜分支动脉闭塞、缺血性视网膜动脉闭塞, 和非-缺血性视网膜动脉闭塞。在一些实施方案中, ActRII 拮抗剂, 或 ActRII 拮抗剂的组合, 可被用来治疗或预防视网膜闭塞的一种或多种并发症, 包括, 例如黄斑水肿、黄斑缺血、新血管化、青光眼 (glaucoma), 和视网膜剥离。在一些实施方案中, ActRII 拮抗剂, 或 ActRII 拮抗剂的组合, 可被用来提高视网膜闭塞患者的视力 (如, 提高视觉敏锐度和/或增加视野)。任选地, 罹患视网膜闭塞的患者, 除了 ActRII 拮抗剂, 或 ActRII 拮抗剂的组合外, 还可用一种或多种治疗视网膜闭塞的支持疗法 [如, VEGF 拮抗剂 (如, 贝伐单抗、雷珠单抗, 和阿柏西普)、皮质类固醇 (曲安西龙和地塞米松)、手术、激光疗法、光动力学疗法, 和玻璃体切割术] 治疗。

[0352] 黄斑毛细血管扩张症的特征是视网膜中央凹 (其是黄斑的中心) 周围的损伤, 并表现为两种形式。2型黄斑毛细血管扩张症是该疾病的最常见形式并表现为血管视网膜中央凹周围的渗漏。这个渗漏可导致黄斑水肿和新血管化, 部分地由于玻璃体出血而影响中枢视力。同样, 结缔组织可在黄斑和视网膜中央凹上形成, 导致精细视力丧失。2型黄斑毛细血管扩张症影响两只眼睛, 但并不一定有同样的严重程度。在1型黄斑毛细血管扩张症中, 血管视网膜中央凹周围因形成细小的动脉瘤而成为扩张的, 其可促进黄斑水肿和新血管化。1型黄斑毛细血管扩张症几乎总是发生在一只眼睛, 这使它与2型形式的疾病区别开来。

[0353] 黄斑毛细血管扩张症的治疗一般是通过监测患者和治疗并发症如黄斑水肿和新血管化保持视力。黄斑毛细血管扩张症的这样的并发症可通过施用VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普)治疗。在一些情况下、黄斑毛细血管扩张症用手术、激光疗法(如,激光光凝固、改良格栅激光光凝固、泛视网膜光凝固,和光动力学疗法)和/或玻璃体切割术治疗。

[0354] 在某些方面,本公开内容提供通过施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)],在有需要的患者中治疗或预防黄斑毛细血管扩张症的方法和组合物。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防以下的一种或多种:2型黄斑毛细血管扩张症和1型黄斑毛细血管扩张症。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防黄斑毛细血管扩张症的一种或多种并发症,包括,例如微动脉瘤、黄斑水肿、新血管化,和玻璃体出血。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来提高黄斑毛细血管扩张症患者的视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野)。任选地,罹患黄斑毛细血管扩张症的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一种或多种治疗视网膜黄斑毛细血管扩张症的支持疗法[如,VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普)、手术、激光疗法(如,激光光凝固、改良格栅激光光凝固、视网膜光凝固,和光动力学疗法),和玻璃体切割术]治疗。

[0355] 早产儿视网膜病变(ROP),也称为特里综合征(Terry syndrome)或视网膜纤维瘤,是一种在患有视网膜周围异常血管生长的早产儿中发生的眼睛疾病[Phelps D.L. (2001) NeoReview2(7):153-166]。视网膜周围的新血管化可导致黄斑水肿和玻璃体出血,损害视力。在一些情况下,新血管化导致视网膜周围的结缔组织形成,其可促进视网膜剥离。患有ROP的患者,特别是发生严重疾病的那些,在生命后期对近视(近视)、弱视(弱视眼)、斜视(错位的眼睛)、白内障,和青光眼具有更大的危险。

[0356] ROP的治疗一般是通过监测患者和治疗并发症如黄斑水肿、视网膜出血、新血管化、玻璃体出血,和视网膜剥离保持视力。ROP的这样的并发症可通过施用VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西普)治疗。在一些情况下,ROP用手术、激光疗法(如,激光光凝固、改良格栅激光光凝固、泛视网膜光凝固,和光动力学疗法)和/或玻璃体切割术治疗。巩膜扣带手术和充气性视网膜固定术是修复视网膜剥离的普通眼科手术。最近, $\beta$ -阻断剂(如,普萘洛尔(propranolol))已经被证明延缓ROP的进展,特别是通过抑制视网膜血管生成,从而改善血液-视网膜屏障功能障碍[Ristori C. (2001) Invest Ophthalmol Vis Sci 52(1):155-170]。

[0357] 在某些方面,本公开内容提供通过施用一种或多种ActRII拮抗剂[如,ActRII多肽或其变体(如,GDF诱捕剂)],在有需要的患者中治疗或预防早产儿视网膜病变的方法和组合物。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来治疗或预防早产儿视网膜病变的一种或多种并发症,包括,例如视网膜出血、黄斑水肿、新血管化、玻璃体出血,和视网膜剥离。在一些实施方案中,ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合,可被用来提高早产儿视网膜病变患者的视力(如,提高视觉敏锐度和/或增加视野)。任选地,罹患早产儿视网膜病变的患者除了ActRII拮抗剂,或ActRII拮抗剂的组合外,还可用一种或多种治疗早产儿视网膜病变的支持疗法[如,VEGF拮抗剂(如,贝伐单抗、雷珠单抗,和阿柏西

普)、β阻断剂(普萘洛尔)、手术、激光疗法(如,激光光凝固、改良格栅激光光凝固、泛视网膜光凝固,和光动力学疗法)、玻璃体切割术、巩膜扣带手术和/或充气性视网膜固定术]治疗。

[0358] 如本文所用的,“与…组合”或“联合施用”指任何形式的施用,以致额外的疗法(如,第二、第三、第三等等)在体内仍是有效的(如,多个化合物在患者中同时施用,这可包括那些化合物的协同作用)。有效性可与药物在血液、血清,或血浆中的可测量的浓度相关。例如,不同的治疗化合物可或者以相同的制剂或者以分开的制剂,或者同时或者顺序,并根据不同方案施用。因此,接受这样的治疗的个体可得益于不同的疗法的合并作用。本公开内容的一种或多种ActRII拮抗剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂、抗体等等)可与一种或多种其它额外的药剂或支持疗法同时、在此之前或之后施用。一般来说,每个治疗剂将以对该特定药物测定的剂量和/或按照时间表施用。用于给药方案的特定组合将考虑本公开内容的拮抗剂与所述疗法和/或所需药物的适配性。

[0359] 视觉敏锐度(VA)是视力的视敏度或清晰度,其部分地取决于眼睛内视网膜焦点的锐度和大脑解释能力的敏感度。视觉敏锐度是衡量视觉处理系统的空间分辨率的一种量度。在一些实施方案中,VA通过要求测试视力的人识别字符来测试,通常在离开设定距离的图表上的数字或字母。一般来说,图表上的字母作为在白色背景下的黑色符号来表示。人的眼睛和测试图表之间的距离被设置在以透镜试图以近似无穷远的方式聚焦的足够距离上。在一些实施方案中,20英尺,或6米,从光学角度看,基本上是无穷大的。

[0360] 一个测量VA的非-限制性手段是使用ESV-3000ETDRS测试装置(见,US 5,078,486),一种自行校准的测试照明。ESV-3000装置结合LED光源技术。自动校正电路持续监测LED光源并校准测试光亮度至85cd/m<sup>2</sup>或3cd/m<sup>2</sup>。虽然设计了临床试验,其中大规格ETDRS测试(至多20/200)在4米处执行,所述装置可用于非-研究环境,例如,进行眼睛疾病监测的医院或诊所。在一些实施方案中,测试是在标准化照明条件下进行的,例如,85cd/m<sup>2</sup>的光场测试水平。这种光照水平已被美国国家科学院(National Academy of Sciences)和美国国家标准研究院推荐用于ETDRS和对比敏感度视力测试。视觉敏锐度的评分可以通过监测器选择的任何方式完成。在提供基线评价后,通过测试个体识别字母数量的增加或降低提供在治疗期间视力增加或降低的量度。测量VA的其它方法包括,例如,Snellen试验、E图试验(E chart test),和Near试验。

[0361] 一方面,本公开内容提供在患有如本文描述的眼睛血管性疾病的个体中提高视觉敏锐度的方法和组合物。一般来说,这些方法包括施用于有需要的患者有效量的一种或多种ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,所述方法提供受治疗眼睛可识别的字母数量从约1增加至约30字母的方法。在另一个实施方案中,可识别的字母数量从约5增加至约25个字母。在进一步的实施方案中,可识别的字母数量从约5增加至约20字母。在另一个进一步的实施方案中,可识别的字母数量从约5增加至约15个字母。在更进一步的实施方案中,可识别的字母数量从约5增加至约10字母。在又一个实施方案中,可识别的字母数量从约10增加至约25个字母。在仍然更进一步的实施方案中,可识别的字母数量从约15增加至约25个字母。在还有的另一个实施方案中,可识别的字母数量从约20增加至约25个字母。

[0362] 一般来说,视野可通过患者能够外周看到的全部水平和垂直范围的视野测试来测定。这种类型的测试通常都是用自动周边测试进行,其中患者盯着正前方的光源且不同密度的随机光线在他们周围的视野中闪烁。所述患者按一个按钮或其它的方法来表示他们能

看见光。可根据本文描述的方法使用的视野试验包括例如,安斯勒格栅试验(Amsler grid test)、对照试验(confrontation test)、周界试验(perimetry test)和切线屏试验(tangent screen test)。

[0363] 一方面,本公开内容提供在患有如本文描述的眼睛血管性疾病的个体中增加视野的方法和组合物。一般来说,这些方法包括施用于有需要的患者有效量的一种或多种ActRII拮抗剂。在一些实施方案中,所述方法提供增加患者的视野至少10%(如,至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%)的手段。

[0364] 无效的红细胞生成的最常见原因是地中海贫血综合征,遗传性血红蛋白病,其中生产完整的 $\alpha$ -和 $\beta$ -血红蛋白链的失衡导致在促红细胞成熟期间细胞凋亡增加(Schrier, 2002, Curr Opin Hematol 9:123-126)。地中海贫血总体是最常见的遗传病之一,随着流行病学模式的改变,预计将导致美国 and 全球日益严重的公共卫生问题(Vichinsky, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:18-24)。地中海贫血综合征是根据其严重程度来命名的。因此, $\alpha$ -地中海贫血包括轻型 $\alpha$ -地中海贫血(也称为 $\alpha$ -地中海贫血特征;两个受影响的 $\alpha$ -球蛋白基因)、血红蛋白H疾病(3个受影响的 $\alpha$ -球蛋白基因),和重型 $\alpha$ -地中海贫血(也称为胎儿水肿(hydrops fetalis);4个受影响的 $\alpha$ -球蛋白基因)。 $\beta$ -地中海贫血包括轻型 $\beta$ -地中海贫血(也称为 $\beta$ -地中海贫血特征;一个受影响的 $\beta$ -球蛋白基因)、中间型 $\beta$ -地中海贫血(两个受影响的 $\beta$ -球蛋白基因)、血红蛋白E地中海贫血(两个受影响的 $\beta$ -球蛋白基因),和重型 $\beta$ -地中海贫血(也称为库利氏贫血(Cooley's anemia);两个受影响的 $\beta$ -球蛋白基因,导致 $\beta$ -球蛋白完全缺乏)。 $\beta$ -地中海贫血影响多个器官,与相当的发病率和死亡率有关,且目前需要终身护理。虽然 $\beta$ -地中海贫血患者的预期寿命近年来增加,由于使用定期输血与螯合,输血和过度的胃肠吸收铁造成的铁超载组合可造成严重的并发症如心脏病、血栓形成、性腺功能减退、甲状腺机能减退、糖尿病、骨质疏松症,和骨质减少症(Rund et al, 2005, N Engl J Med 353:1135-1146)。ActRII拮抗剂,任选地与一种或多种额外的支持疗法组合,可用于治疗地中海贫血综合征。

[0365] ActRII拮抗剂,任选地与一种或多种额外的支持疗法组合,除地中海贫血综合征外,还可用于治疗无效的红细胞生成疾病。这样的疾病包括铁粒幼细胞性贫血(siderblastic anemia)(遗传或后天获得);红细胞生成障碍性贫血(类型I和II);镰状细胞贫血;遗传性球形红细胞增多症;丙酮酸激酶缺乏症;巨幼红细胞性贫血,能是由病症如叶酸缺乏造成的(由于先天性疾病、摄入量减少或需求增加)、钴胺缺乏症(由于先天性疾病、恶性贫血、吸收受损、胰腺功能不全或摄入量减少)、某些药物,或不能解释的原因(先天性红细胞生成障碍性贫血、难治性巨细胞贫血或红细胞白血病);骨髓痠性贫血,包括骨髓纤维变性(骨髓样化生)和骨髓痠;先天性生血性卟啉症;和铅中毒。

[0366] 骨髓增生异常综合征(MDS)是以骨髓血细胞无效产生和转化为急性骨髓性白血病的风险为特征的多种血液学疾病的集合。在MDS患者中,造血干细胞不能成熟为健康的红细胞、白细胞,或血小板。MDS疾病包括,例如,难治性贫血、难治性细胞减少伴有单系发育不良(RCUD)、难治性贫血伴有环形铁粒幼细胞(RARS)、难治性贫血伴有与明显的血小板增多有关的环形铁粒幼细胞(RARS-T)、难治性贫血伴有过量芽细胞(RAEB-1)、难治性贫血伴有转化中的过量芽细胞(RAEB-2)、难治性细胞减少症伴有多系发育不良(RCMD)、未分类的MDS

(MDS-U), 和与分离的5q染色体异常相关的骨髓增生异常综合征[具有de1(5q)的MDS]。

[0367] MDS患者最终需要输血和/或用促红血球生成生长因子(如,ESAs如EPO)单独或与集落-刺激因子[如,粒细胞集落-刺激因子(G-CSF)的类似物如非格司亭或粒细胞巨噬细胞集落-刺激因子(GM-CSF)的类似物如沙格司亭]组合治疗,以增加红细胞水平。输血的频率取决于疾病的严重程度和并存病存在。已知长期输血会增加血红蛋白水平,其依次改善脑和外周组织氧合作用,从而提高身体活动和精神警觉。然而,许多MDS患者因使用这样的疗法而产生副作用。例如,经常接受红血球输血的患者可因铁积聚和毒性活性氧类物质的生成而发展为组织和器官损伤。因此,本公开内容的一种或多种ActRII拮抗剂药剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂等等),任选地与EPO受体激活剂组合,可被用来治疗患有MDS或铁粒幼细胞性贫血的患者。在某些实施方案中,患者罹患MDS或铁粒幼细胞性贫血可使用本公开内容的一种或多种ActRII拮抗剂药剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂等)治疗,任选地与EPO受体激活剂组合。在其它实施方案中,罹患MDS或铁粒幼细胞性贫血的患者可使用本公开内容的一种或多种ActRII拮抗剂药剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂等等)和一种或多种用于治疗MDS的额外的治疗剂组合来治疗,所述治疗剂包括,例如,ESAs;G-CSF类似物,包括非格司亭;GM-CSF类似物,包括沙格司亭;来那度胺;沙利度胺;泊马度胺(pomalidomide)、减甲基化剂(hypomethylating agents),包括阿扎胞苷和地西他滨;铁螯合剂,包括去甲氧胺(deferoxamine)和地拉罗司(deferasirox);拟血栓素(thrombopoietin mimetics),包括罗米司亭(romiplostim)和艾曲波帕;化学治疗剂,包括阿糖胞苷(ara-C)单独或与伊达比星、托泊替康,或氟达拉滨组合;免疫抑制剂,包括抗胸腺细胞球蛋白、阿仑珠单抗,和环孢菌素;组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDAC抑制剂),包括伏林司他、丙戊酸、苯丁酸酯、恩替诺特(entinostat)、MGCD0103,和其它I类核HDAC抑制剂,II类非-核HDAC抑制剂,泛HDAC抑制剂,和同工型-特异性HDAC抑制剂;法呢酰基转移酶抑制剂,包括如替匹法尼和氯那法尼;肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )抑制剂,包括依那西普或英夫利昔单抗;谷胱甘肽-S-转移酶(GST)P1-1的抑制剂,包括ezatiostat;和CD33抑制剂,包括吉姆单抗、奥佐米星。

[0368] 如本文所述的,显示出环形铁粒幼细胞的患者可特别适合于用ActRII拮抗剂治疗。铁粒幼细胞性贫血在广义上可以分为先天性(遗传的)和后天获得的形式,其可如表1中所示进一步进行细分。

表1. 铁粒幼细胞性贫血的分级\*

| 类别                          | 基因                | 贫血严重程度 | 铁稳态 |
|-----------------------------|-------------------|--------|-----|
| 先天性                         |                   |        |     |
| 非综合征                        |                   |        |     |
| X-有关的                       | <i>ALAS2</i>      | 轻度至重度  | 铁超载 |
| SLC25A38缺乏                  | <i>SLC25A38</i>   | 重度     | 铁超载 |
| 谷氧还蛋白5缺乏                    | <i>GLRX5</i>      | 轻度至重度  | 铁超载 |
| 促红细胞生成原卟啉症                  | <i>FECH</i>       | 轻度     | --- |
| 综合征的                        |                   |        |     |
| X-有关的共济失调                   | <i>ABCB7</i>      | 轻度至中度  | --- |
| SIFD                        | 未知的               | 重度     | 铁超载 |
| Pearson骨髓-胰腺综合征             | mtDNA             | 重度     | --- |
| 肌病、乳酸酸中毒, 和铁粒幼细胞性贫血 (MLASA) | <i>PUS1/YARS2</i> | 轻度至重度  | --- |
| 硫胺-反应巨幼细胞性贫血 (TRMA)         | <i>SLC19A2</i>    | 重度     | --- |
| 综合征的/非综合征的未知原因              | 未知的               | 变化的    | --- |
| 后天获得的                       |                   |        |     |
| 克隆的/瘤的                      |                   |        |     |
| MDS**                       | 变化的               | 轻度至重度  | 铁超载 |
| 代谢的                         |                   |        |     |
| 酒精中毒                        | ---               | 变化的    | --- |
| 药物-诱导的                      | ---               | 变化的    | --- |
| 铜缺乏(锌毒性)                    | ---               | 变化的    | --- |
| 低体温症                        | ---               | 变化的    | --- |

[0370] \*见Bottomley et al., 2014, Hematol Oncol ClinNA 28:653-670。

[0371] \*\*见下表根据世界卫生组织(WorldHealth Organization)对MDS子分类。

[0372] 在过去的几年里,新的测序技术已导致鉴定几十种MDS中反复突变的基因。2013年的按类型分类的这样的基因的列表表示于表2中。一种或多种这样的突变可在几乎所有的MDS患者中发现,并且了解所涉及的基因的性质,有助于增进理解MDS是如何发展和演变的,尽管它还没有对治疗产生影响。应用于MDS患者样本的全部-基因组测序已经确认了全新类别的与癌症相关的编码mRNA剪接(剪接体)因子的基因。在MDS中鉴定的第一个这样的基因是SF3B1,其在RARS患者中特别频繁地突变[Papaemmanuil et al. (2011) N Engl JMed 365: 1384-1395]。其它主要类别的突变基因是表观遗传(DNA甲基化)调控基因,转录因子,和信

号传导分子[Cazzola et al. (2013) Blood 122:4021-4034; Bejar et al. (2014) Blood 124:2793-2803]。这些突变在MDS患者中共同发生的程度似乎随着基因类型的不同而不同。例如,大约50%的MDS患者具有十个到目前为止被确定为编码突变剪接因子的基因之一,但这些突变体基因很少同时出现在相同的患者中[Bejar et al. (2014) Blood 124:2793-2803]。因此,这些突变体基因很少是相同个体的多余标记。编码突变体表观遗传调节物的基因彼此同时存在的频率更高,并且在相同的患者中有突变体剪接因子基因。如本文公开的,突变基因如表2中所列的那些的差异存在提供遗传特征,其可有助于预测哪些MDS或铁粒幼细胞性贫血患者可能对ActRII拮抗剂在治疗上有反应或者没有反应。

表2. MDS-相关的体细胞突变\*

| 基因                 | MDS发生率<br>(%病例) |
|--------------------|-----------------|
| RNA剪接              |                 |
| <i>SF3B1</i>       | 14-28           |
| <i>SRSF2</i>       | 15              |
| <i>U2AF1</i>       | 8               |
| <i>ZRSR2</i>       | 6               |
| <i>PRPF40B</i>     | 1               |
| <i>SF3A1</i>       | 1               |
| <i>SF1</i>         | 1               |
| <i>U2AF65</i>      | < 1             |
| <i>LUC7L2</i>      | 罕见              |
| <i>PRPF8</i>       | 罕见              |
| 表观遗传调控基因           |                 |
| <i>TET2</i>        | 19-26           |
| <i>ASXL1</i>       | 10-20           |
| <i>DNMT3A</i>      | 10              |
| <i>IDH1 / IDH2</i> | 4-12            |
| <i>EZH2</i>        | 6               |
| <i>UTX</i>         | 1               |
| <i>ATRX</i>        | < 1             |
| 转录因子               |                 |
| <i>RUNX1</i>       | 10-20           |
| <i>TP53</i>        | 4-14            |
| <i>ETV6</i>        | 1-3             |
| <i>PHF6</i>        | 罕见              |
| <i>WT1</i>         | 罕见              |
| 信号传导               |                 |
| <i>NRAS</i>        | 10              |
| <i>CBL</i>         | 3               |
| <i>JAK2</i>        | 3               |
| <i>FLT3</i>        | 2-3             |
| <i>KRAS</i>        | 1-2             |
| <i>c-KIT</i>       | 1               |
| <i>BRAF</i>        | < 1             |
| <i>CDKN2A</i>      | < 1             |
| <i>GNAS</i>        | < 1             |
| <i>PTEN</i>        | < 1             |
| <i>PTPN11</i>      | < 1             |
| <i>CBLB</i>        | 罕见              |
| <i>MPL, CSF1R</i>  | 罕见              |
| 其它                 |                 |
| <i>NPM1</i>        | 2-3             |

[0373]

[0374] \*来自Tothova et al. (2013) Clin Cancer Res 19:1637-1643。

[0375] 在表2中列出的基因中, 编码剪接因子3B1 (SF3B1) 的基因最近已被认为在MDS, 特

别是在RARS、RARS-T,和RCMD-RS亚型中至关重要[Malcovati et al. (2011) Blood 118: 6239-6246; Dolatshad et al. (2014) Leukemia doi:10.1038/leu.2014.331,先于纸质印刷的电子文档公布]。SF3B1中的体细胞突变也发生在血液癌,包括慢性淋巴细胞性白血病(CLL),和急性骨髓性白血病(AML)以及在乳腺癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌,和眼色素层黑色素瘤[Malcovati et al. (2011) Blood 118:6239-6246; Wang et al. (2011) N Engl J Med 365:2497-2506; The Cancer Genome Atlas Network (2012) Nature 490:61-70; Biankin et al. (2012) Nature 491:399-405; Chesnais et al. (2012) Oncotarget 3: 1284-1293; Furney et al. (2013) Cancer Discov 3:1122-1129; Je et al. (2013) Int J Cancer 133:260-266]中。SF3B1突变谱,许多聚集在蛋白质的少数位置,已在临床样本或在细胞系暴露于高浓度的pladienolide中被鉴定[Webb et al. (2013) Drug Discov Today 18:43-49]。在MDS中鉴定的SF3B1突变包括,例如,K182E、E491G、R590K、E592K、R625C、R625G、N626D、N626S、H662Y、T663A、K666M、K666Q、K666R、Q670E、G676D、V701I、I704N、I704V、G740R、A744P、D781G和A1188V。在癌中鉴定的SF3B1突变包括,例如,N619K、N626H、N626Y、R630S、I704T、G740E、K741N、G742D、D894G、Q903R、R1041H和I1241T。最后,在MDS和癌二者中发现的SF3B1突变包括,例如,G347V、E622D、Y623C、R625H、R625L、H662D、H662Q、T663I、K666E、K666N、K666T、K700E和V701F。

[0376] 在本公开内容的一个实施方案中,ActRII拮抗剂可用于治疗患者,包括MDS患者或铁粒幼细胞性贫血患者的眼睛的血管性疾病,在他们中超过1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%,或95%的红细胞前体是环形铁粒幼细胞,例如,在伴有环形铁粒幼细胞的难治性贫血(RARS)、与明显的血小板增多症相关的RARS (RARS-T),或难治性细胞减少症伴有多系发育不良的(RCMD,在其中环形铁粒幼细胞占优势的患者中也称为RCMD-RS)。

[0377] 许多基因导致了经典的镰状细胞病(SCD;镰状细胞病)。首先,镰状细胞病是一种由 $\beta$ -球蛋白基因突变(谷氨酸突变缬氨酸在密码子6中)引起的遗传疾病。见例如,Kassim et al. (2013) Annu Rev Med, 64:451-466。镰状-细胞贫血指最常见形式的镰状细胞病,具有在 $\beta^S$ 等位基因中的纯合子突变(HbSS),影响60-70%的患有镰状细胞病的人群。由于在 $\beta$ -球蛋白基因中的突变,异常血红蛋白分子当它处于脱氧状态时,用暴露的疏水性基序生产[见例如,Eaton et al. (1990) Adv Protein Chem, 40:63-279; Steinberg, MH (1999) N Engl J Med 340(13):1021-1030; 和 Ballas et al. (1992) Blood, 79(8):2154-63]。一旦暴露,分离的血红蛋白分子链聚合,这导致对红细胞膜的损伤和细胞脱水。膜损伤部分地通过膜脂质的再分配,导致磷脂酰丝氨酸红细胞膜外小叶上的表达而表现出来[见例如, (2002) Blood 99(5):1564-1571]。外化磷脂酰丝氨酸促进对巨噬细胞和激活的内皮细胞二者的粘附,这导致血管性(vaso) 闭塞。因此,在低氧状态下,红细胞的血红蛋白沉淀成为长晶体,使其拉长,在形态上转变成“镰刀状”红细胞。基因型和脱氧度的程度二者导致严重程度的血红蛋白聚合。已经证明胎儿血红蛋白的存在按比例减少病理性血红蛋白聚合物的数量,因而防止血管闭塞的危险。

[0378] 对大多数镰状细胞病患者的主要治疗是支持性的。目前对镰状细胞病患者的治疗选项包括抗生素、疼痛控制[如,用一种或多种麻醉剂、非-甾体抗-炎性药物和/或皮质类固

醇治疗)、静脉输液、输血、手术、铁螯合疗法(如,脱铁氧胺)和羟基脲(如Droxia®)].在一些实施方案中,本公开内容一种或多种ActRII拮抗剂药剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂等等),可被用来在有需要的患者中与一种或多种治疗镰状细胞病的额外的药剂和/或支持疗法(如,用一种或多种麻醉剂、非-甾体抗-炎性药物和/或皮质类固醇治疗)、静脉输液、输血、手术、铁螯合疗法(如,脱铁氧胺)和羟基脲)组合治疗镰状细胞病。

[0379] 在某些实施方案中,本公开内容提供管理患者的方法,所述患者已经用一种或多种本公开内容的ActRII拮抗剂[如,ActRIIA多肽以及其变体(如GDF诱捕剂)]治疗,或者通过测量患者的一种或多种血液学参数而为将要用一种或多种本公开内容的ActRII拮抗剂[如,ActRIIA多肽以及其变体(如GDF诱捕剂)]治疗的候选者。血液学参数可被用来评价将要用本公开内容的拮抗剂治疗的候选者的患者的适当剂量,以在治疗期间监测血液学参数,评价是否在用本公开内容的一种或多种拮抗剂治疗期间调节剂量和/或评价本公开内容的一种或多种拮抗剂的适当的维持剂量。如果一种或多种血液学参数是在正常水平之外,一种或多种ActRII拮抗剂的剂量可被减少、延迟或终止。

[0380] 可根据本文提供的方法测量的血液学参数包括,例如,红细胞水平、血压、铁储存,和体液中发现的与红细胞水平升高相关的药物其它药剂(使用本领域公认的方法)。这样的参数可使用得自患者的血液样本测定。红细胞水平、血红蛋白水平和/或红细胞比容水平的增加可导致血压增加。

[0381] 在一个实施方案中,如果一种或多种血液学参数在正常范围之外或在要用一种或多种ActRII拮抗剂治疗的候选者的患者正常值高侧,则可推迟开始施用一种或多种拮抗剂,直至血液学参数回到正常的状态或自然或通过治疗干预达到可接受的水平。例如,如果候选患者是高血压或高血压前期,则所述患者可用降压药治疗以降低患者的血压。可使用适合于个体患者的病症的任何降压药,包括,例如,利尿剂、肾上腺素抑制剂(包括 $\alpha$ 阻滞剂和 $\beta$ 阻滞剂)、血管扩张剂、钙通道阻滞剂、血管紧张素-转化酶(ACE)抑制剂,或血管紧张素II受体阻滞剂。血压也可以通过饮食和锻炼方案来治疗。类似地,如果候选患者的铁储存低于正常水平,或在正常值的低侧,则所述患者可用饮食和/或补铁剂的适宜的方案治疗,直至所述患者的铁储存回到正常的状态或可接受的水平。对于具有高于正常红细胞水平和/或血红蛋白水平的患者,则可推迟施用本公开内容的一种或多种拮抗剂,直至水平回到正常的状态或可接受的水平。

[0382] 在某些实施方案中,如果一种或多种血液学参数在正常范围之外或在要用一种或多种ActRII拮抗剂药剂治疗的候选患者的正常值高侧,则可推迟开始施药。然而,一种或多种拮抗剂的剂量或给药频率可设定为一定的量,该量将减少施用本公开内容的一种或多种拮抗剂后所致血液学参数的不可接受的增加的危险。或者,可针对所述患者开发合并一种或多种ActRII拮抗剂药剂(如,GDF-ActRII拮抗剂、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、GDF诱捕剂等等)与解决血液学参数的不良水平的治疗剂的治疗方案。例如,如果所述患者升高血压,则治疗方案可设计为包括施用一种或多种ActRII拮抗剂和降压药。对于具有低于所需铁储存的患者,治疗方案可设计为包括一种或多种ActRII拮抗剂和补铁剂。

[0383] 在一个实施方案中,对于一种或多种血液学参数的基线参数可针对要用一种或多种ActRII拮抗剂药剂治疗的候选患者建立,而适宜的剂量方案根据基线值为患者剂量。或

者,基于患者的医治史建立的基线参数可被用来为患者提供适当的拮抗剂剂量方案。例如,如果健康患者具有建立的基线血压读数高于规定的正常范围,则在用本公开内容的一种或多种拮抗剂治疗前可能不必使所述患者的血压进入对一般人群认为是正常的范围内。患者在用一种或多种ActRII拮抗剂治疗前的一种或多种血液学参数的基线值,也可作用在本文描述的一种或多种拮抗剂治疗期间监测血液学参数的任何改变的相关的比较值。

[0384] 在某些实施方案中,对用一种或多种ActRII拮抗剂治疗的患者测量一种或多种血液学参数。血液学参数可被用来在治疗期间监测患者并允许调节或终止本公开内容的一种或多种拮抗剂剂量或另一种治疗剂的额外剂量。例如,如果施用一种或多种ActRII拮抗剂导致血压、红细胞水平,或血红蛋白水平增加,或铁储存减少,则本公开内容的一种或多种拮抗剂的剂量可在数量或给药频次方面减少,以降低本公开内容的一种或多种拮抗剂对一种或多种血液学参数的影响。如果施用一种或多种ActRII拮抗剂导致一种或多种血液学参数对所述患者不利的变化,则本文描述的一种或多种拮抗剂的剂量可被终止或者暂停,直至血液学参数回到可接受的水平,或保持长期不变。类似地,如果一种或多种血液学参数在减少本文描述的一种或多种拮抗剂的施用剂量或频次后,不回到可接受的范围内,则可终止给药。作为一种替代,或除了减少或终止本文描述的一种或多种拮抗剂的给药,所述患者还可用解决血液学参数的不良水平,例如,降压药或补铁剂的额外治疗剂给药。例如,如果用一种或多种ActRII拮抗剂治疗的患者血压升高,则本公开内容的一种或多种拮抗剂的给药可以相同水平持续并将降血压药加入治疗方案中,一种或多种拮抗剂(如,量和/或频次)和降血压药的给药加入治疗方案中,或一种或多种拮抗剂的给药可以终止,而可用降血压药治疗患者。

#### [0385] 6. 药物组合物

[0386] 在某些方面,本公开内容的一种或多种ActRII拮抗剂可单独或者作为药物制剂(也称为治疗组合物或药物组合物)的组分施用。药物制剂指以这样的形式呈现的制剂,即允许其中包含的活性成分(如,本公开内容的药物)的生物活性是有效的且其不包含对制剂将要施用的个体具有不可接受的毒性的额外组分。本化合物可被配制为以任何方便的方式施用以供用于人类或兽药。例如,本公开内容的一种或多种药剂可以与药学上可接受的载体配制。药学上可接受的载体指药物制剂中的并非活性成分的成分,其一般对个体无毒。药学上可接受的载体包括,但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂和/或防腐剂。一般来说,当施用于个体时,用于本公开内容的药物制剂呈现无热源的、生理学上-可接受的形式。可任选地被包含在如上所述制剂中的、并非本文描述的那些的治疗学上有用的药剂,可以本公开内容的方法与本药物联合施用。

[0387] 通常,所述化合物将施用于眼睛包括,例如通过局部施用、眼内(如,玻璃体内)注射,或通过植入或装置。玻璃体内注射可例如,通过缘后3mm-4mm的睫状环注射。施用于眼睛的药物组合物可以多种方式配制,包括,例如,滴眼剂、眼科溶液、眼科悬浮液、眼科乳剂、玻璃体内注射、sub-Tenon注射、眼科生物可降解植入物,和非-生物可降解眼科插入物或贮库。

[0388] 在一些实施方案中,所述化合物将经胃肠外施用[如,经玻璃体内(I.V.)注射、动脉内注射、骨内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射,或皮内注射]。

[0389] 适合于眼睛或胃肠外施用的药物组合物可包含与一种或多种药学上可接受的无

菌等渗水或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液组合的一种或多种本公开内容的药剂,或可在临用前重新组成为无菌溶液或分散液的无菌粉末。溶液或分散液可含有抗氧化剂、缓冲剂、杀菌剂、助悬剂、增稠剂,或使制剂与预定的接受者血液等渗的溶质。可用于本公开内容的药物制剂的合适水性和非水载体的实例包括水,乙醇、多元醇(如,甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)、植物油(如,橄榄油)、可注射有机酯(如,油酸乙酯),及其适合的混合物。例如,可以通过使用涂层材料(如,卵磷脂)来保持适当的流动性,通过在分散的情况下维持所需的颗粒尺寸,和通过使用表面活性剂。

[0390] 在一些实施方案中,本公开内容的治疗方法包括系统地,或局部地,从植入物或装置施用药物组合物。此外,药物组合物可被包裹或以递送至靶组织位点(如,骨髓或肌肉)的形式注射。在某些实施方案中,本公开内容的组合物可包含基质能够递送一种或多种本公开内容的药物至靶组织位点(如,骨髓或肌肉),为发育中的组织提供结构并最好能够吸收到体内。例如,基质可提供本公开内容的一种或多种药物的缓慢释放。这样的基质可由目前用于其它植入医疗用途的材料形成。

[0391] 基质材料的选择可基于以下的一种或多种:生物相容的、生物可降解的、机械性能、外观和界面特性。主题组合物的特定应用将限定适宜的制剂。用于组合物的有效的基质可以是生物可降解的和化学定义的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸和聚酸酐。其它有效的材料是生物可降解的和生物学充分限定的,包括,例如骨或皮肤胶原。进一步的基质包含纯蛋白或细胞外基质组分。其它有效的基质是非-生物可降解的和化学限定的,包括,例如,烧结羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其他陶瓷。基质可包含任何上述类型的材料的组合,包括,例如,聚乳酸和羟基磷灰石或胶原蛋白和磷酸三钙。生物陶瓷的成分可以改变(如,磷酸铝钙)并加工以改变孔隙大小、颗粒大小、颗粒形状和生物降解性的一种或多种。

[0392] 在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物可,例如,以胶囊、药包(Cachets)、丸剂、片剂、糖锭剂(使用一种有香味的基质,如蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、散剂、颗粒剂、在水性或非-水液体中的溶液或混悬液、水包油或油包水液体乳剂,或酞剂或糖浆剂,或锭剂(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口液的形式经口服施用,各自含有预定量的本公开内容的化合物和任选的一种或多种其它活性成分。本公开内容的化合物和任选地一种或多种其它活性成分也可作为大丸药、干药糖剂,或糊剂施用。

[0393] 在口服施用的固体剂型(如,胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂,和颗粒剂)中,一种或多种本公开内容的化合物可与一种或多种药学上可接受的载体混合,所述载体包括,例如,柠檬酸钠、磷酸氢二钙、填充剂或增量剂(如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇,和硅酸)、结合剂(如羧基甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖,和阿拉伯胶)、湿润剂(如,甘油)、崩解剂(如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、硅酸盐,和碳酸钠)、溶液阻滞剂(如石蜡)、吸收加速剂(如季铵化合物)、湿润剂(如,鲸蜡醇和甘油一硬脂酸酯)、吸收剂(如,高岭土和膨润土)、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)、着色剂,及其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物制剂(组合物)也可包含缓冲剂。类似类型的固体组合物可用作在软和硬-填充明胶胶囊中使用一种或多种赋形剂,包括例如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇。

[0394] 口服施用药物组合物的液体剂型可包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酞剂。除了活性成分,液体剂型还可含有本领域常用的惰性稀释剂,包括,例

如,水或其它溶剂、增溶剂和/或乳化剂[如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(如,棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻子,和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇、脱水山梨醇的脂肪酸酯,及其混合物]。除了惰性稀释剂,口服制剂还可包含辅助剂,包括,例如湿润剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、增香剂、防腐剂,及其组合。

[0395] 混悬剂,除了活性的化合物外,还可含有助悬剂包括,例如,乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇、脱水山梨醇酯、微晶纤维素、氢氧化铝、膨润土、琼脂、黄蓍胶,和其组合。

[0396] 防止微生物的作用和/或生长可以通过包括各种抗菌和抗真菌药物来确保,包括,例如,对羟基苯甲酸酯,氯丁醇和酚山梨酸。

[0397] 在某些实施方案中,在组合物中包含等渗剂包括,例如,糖或氯化钠可能是合乎需要的。此外,可注射药物形式的延长吸收可能是由于包含了一种延迟吸收的试剂,包括,例如,单硬脂酸铝和明胶所致的。

[0398] 要理解剂量方案将由主治医师在考虑改变本公开内容的一种或多种药物的作用的多种因素后确定。多种因素包括,但不限于,所述患者的红细胞计数、血红蛋白水平、所需目标红细胞计数、患者的年龄、患者的性别、患者的饮食,任何可能导致红细胞水平下降的疾病的严重程度、施用次数,和其它临床因素。将其它已知的活性的药物添加到最终的组合物中也可影响剂量。可以通过定期评估一种或多种红细胞水平、血红蛋白水平、网状细胞水平和造血过程的其它指标来监测进展情况。

[0399] 在某些实施方案中,本公开内容也提供体内产生一种或多种本公开内容的药物的基因疗法。这样的疗法将通过将药剂序列引入患有如上列出的一种或多种疾病的细胞或组织达到其治疗作用。药剂序列的递送可,例如,通过使用重组表达载体如嵌合病毒或胶体扩散系统实现。一种或多种本公开内容的药物序列的优选治疗递送是使用定向脂质体。

[0400] 可用于本文讲述的基因疗法的多种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘,或RNA病毒(如,逆转录病毒)。逆转录病毒载体可以是鼠或禽逆转录病毒的衍生物。其中单一外来基因可插入的逆转录病毒载体的实例包括,但不限于:莫罗尼鼠(Moloney murine)白血病病毒(MoMuLV)、Harvey小鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV),和瘤状肉瘤病毒(RSV)。许多额外的逆转录病毒载体可结合多个基因。所有这些载体可为可选择的标记转移或结合一个基因,以致可以识别并生成被转导的细胞。逆转录病毒载体可以通过附加例如糖、糖脂或蛋白质等而成为靶-特异性的。优选的靶向是使用抗体完成的。本领域技术人员将认识到,特异性多核苷酸序列可插入逆转录病毒基因组中或附着于病毒披膜上,以允许靶特异性递送含有一种或多种本公开内容的药物的逆转录病毒载体。

[0401] 或者,组织培养细胞可通过常规磷酸钙转染,用编码逆转录病毒结构基因(gag、pol和env)的质粒直接转染。再将这些细胞用含有感兴趣的基因的载体质粒转染。生成的细胞将逆转录病毒载体释放到培养基中。

[0402] 用于本公开内容的一种或多种药物的另一个靶向递送系统是胶体扩散系统。胶体扩散系统包括,例如,大分子配合物、纳米胶囊、微球、珠粒,和基于脂质的系统包括水包油乳剂、胶束、混合的胶束,和脂质体。在某些实施方案中,本公开内容的优选的胶体系统是脂质体。所述脂质体是人造的膜囊泡,其作为体外和体内的递送媒介是有用的。RNA、DNA,和完整病毒体可封装在水的内部并以生物活性的形式递送到细胞[见例如,Fraleley,etal.

(1981) Trends Biochem.Sci.,6:77]。利用脂质体载体进行高效基因转移的方法是本领域已知的[见例如,Mannino,et al.(1988)Biotechniques,6:682,1988]。

[0403] 脂质体的组成通常是磷脂的组合,其可包含类固醇(如胆固醇)。脂质体的物理特征依赖于pH、离子强度,和二价阳离子的存在。其它磷脂或其它脂质也可使用,包括,例如磷脂酰化合物(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、脑苷或神经节苷)、卵磷脂胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱,和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向也可能以例如器官特异性、细胞特异性,和细胞器特异性为基础且是本领域已知的。

[0404] 范例

[0405] 现在一般描述本发明,通过参考以下实施例将更容易地理解它,其被包括在内仅仅是为了说明本发明的某些实施方案和实施方案的目的,且不打算限制本发明。

[0406] 实施例1:ActRIIa-Fc融合蛋白

[0407] 本申请人构建了可溶性ActRIIA融合蛋白,其具有融合于人类或小鼠Fc结构域的人ActRIIa的细胞外结构域,伴有之间的最小接头。构建体被分别称为ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc。

[0408] 从CHO细胞系纯化的ActRIIA-hFc在下文显示(SEQ ID NO:32):

[0409] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD

[0410] DINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHT

[0411] CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

[0412] AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPVIEKTIKAKGQPREP

[0413] QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYS

[0414] KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0415] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白在CHO细胞系中表达。考虑了3个不同的前导序列:

[0416] (i)蜂毒肽(Honey bee mellitin)(HBML):MKFLVNVALVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:33)

[0417] (ii)组织纤溶酶原激活剂(TPA):MDAMKRGLCCVLLLGGAVFVSP(SEQ ID NO:34)

[0418] (iii)天然:MGAAAKLAFVFLISCSGA(SEQ ID NO:35)。

[0419] 所选择的形式使用TPA前导并具有以下未经处理的氨基酸序列:MDAMKRGLCCVLLLGGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHC CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPVIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:36)

[0420] 这种多肽由以下核酸序列编码:

[0421] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGT

[0422] TTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTTTTAATGCT

[0423] AATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAG

[0424] ATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAATAGTGAA

[0425] ACAAGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAA

[0426] AAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTT  
 [0427] CTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCAC  
 [0428] CCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG  
 [0429] ACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC  
 [0430] CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA  
 [0431] CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
 [0432] TACAACAGCACGTACCGTGTGGTGTGAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAA  
 [0433] TGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA  
 [0434] ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCAT  
 [0435] CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 [0436] TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
 [0437] ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTG  
 [0438] GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  
 [0439] TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:  
 37)

[0440] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc二者显著受重组表达的影响。如图3中所示,蛋白质被纯化至蛋白的单一的、明确的峰。N-末端测序揭示-ILGRSETQE (SEQ ID NO:38)的单一序列。纯化可通过一系列柱色谱步骤,包括,例如3个或更多个以下步骤,以任何次序实现:蛋白A色谱、Q琼脂糖凝胶色谱、苯基琼脂糖凝胶色谱、尺寸排阻色谱,和阳离子交换色谱。纯化可用病毒过滤和缓冲液交换完成。ActRIIA-hFc蛋白被纯化至>98% (如通过尺寸排阻色谱测定的)和>95%的纯度(如通过SDS PAGE测定的)。

[0441] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc显示了对配体的高亲和力。使用标准胺-偶联程序,将GDF-11或激活素A固定在Biacore™CM5芯片上。将ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白装载于系统上,并测定结合。ActRIIA-hFc以 $5 \times 10^{-12}$ 的分离常数( $K_D$ )结合于激活素和以 $9.96 \times 10^{-9}$ 的 $K_D$ 结合于GDF11。见图4。ActRIIA-mFc有类似的行为。

[0442] ActRIIA-hFc在药代动力学研究中是非常稳定的。大鼠被给予1mg/kg、3mg/kg,或10mg/kg的ActRIIA-hFc蛋白,而蛋白血浆水平测量在24、48、72、144和168小时时测量。在一项分开的研究中,大鼠被给予1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg。在大鼠中,ActRIIA-hFc具有11-14天血清半衰期,而药物的循环水平在2周后相当高(对于初始施用1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg,分别为11 $\mu$ g/ml、110 $\mu$ g/ml或304 $\mu$ g/ml)。在食蟹猴中,血浆半衰期是基本上大于14天,而对于初始施用1mg/kg、10mg/kg,或30mg/kg,药物的循环水平分别是25 $\mu$ g/ml、304 $\mu$ g/ml或1440 $\mu$ g/ml。

[0443] 实施例2:ActRIIA-hFc蛋白的特征鉴定

[0444] 使用SEQ ID NO:34的组织纤溶酶原前导序列,使ActRIIA-hFc融合蛋白在来自pAID4载体(SV40 ori/增强子、CMV启动子)的稳定转染CHO-DUKX B11细胞中表达。如上在实施例1中所述纯化的蛋白具有SEQ ID NO:32的序列。Fc部分是如在SEQ ID NO:32中所示的人类IgG1 Fc序列。蛋白分析揭示,ActRIIA-hFc融合蛋白用二硫键形成为同二聚体。

[0445] CHO-细胞-表达的材料对激活素B配体比对在人类293细胞中表达的ActRIIa-hFc融合蛋白报道的具有更高的亲和力[见,del Re et al. (2004) J Biol Chem.279(51):

53126-53135]。此外,TPA前导序列的使用比其它前导序列提供更大的生产,并且与用天然前导表达的ActRIIA-Fc不同,提供了高度纯化的N-末端序列。使用天然前导序列导致两个主要种类的ActRIIA-Fc,各自具有不同N-末端序列。

[0446] 实施例3:替代ActRIIA-Fc蛋白

[0447] 可根据本文描述的方法使用的多种ActRIIA变体在作为W02006/012627公布的国际专利申请中描述(见例如pp.55-58),其全文通过参考而并入本文。一个替代构建体可具有缺失的C-末端尾(ActRIIA的细胞外结构域的最后15个氨基酸)。对于这样一种构建体的序列呈现如下(有下划线的Fc部分)(SEQ ID NO:39):

[0448] ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQTVGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD

[0449] DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSV

[0450] FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

[0451] RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN

[0452] QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

[0453] FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0454] 实施例4:ActRIIB-Fc融合蛋白的生成

[0455] 本申请人构建了可溶性ActRIIB融合蛋白,其具有融合于人类或小鼠Fc结构域的人ActRIIB的细胞外结构域,伴有之间的最小接头(3个甘氨酸氨基酸)。构建体被分别称为ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc。

[0456] ActRIIB-hFc作为从CHO细胞系纯化的在下文显示(SEQ ID NO:40):GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc蛋白在CHO细胞系中表达。考虑了3个不同的前导序列:(i)蜂毒肽(Honey bee mellitin)(HBML),ii)组织纤溶酶原激活剂(TPA),和(iii)天然:MGAAAKLAFVFLISCSGA(SEQ ID NO:77)。

[0457] 所选择的形式使用TPA前导并具有以下未经处理的氨基酸序列(SEQ ID NO:41):  
MDAMKRGCLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0458] 这种多肽由以下核酸序列编码(SEQ ID NO:42):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA  
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA  
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG  
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC  
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG  
 GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG  
 AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG  
 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC  
 ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC  
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTTT CCCCCAAAA  
 [0459] CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT  
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG  
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC  
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG  
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG  
 TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA  
 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT  
 CAGCCTGACC TGCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG  
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC  
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA  
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG  
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0460] CHO-细胞-生产的材料的N-末端测序揭示-GRGEAE (SEQ ID NO:43) 的主要序列。注意的是,在该文献中报道的其它构建体用-SGR...序列开始。

[0461] 纯化可通过一系列柱色谱步骤,包括,例如,3个或更多个以下步骤,以任何次序完成:蛋白A色谱、Q琼脂糖凝胶色谱、苯基琼脂糖凝胶色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0462] ActRIIB-Fc融合蛋白也在HEK293细胞和COS细胞中表达。虽然来自所有细胞系的材料和合理的培养条件在体内提供具有肌肉构建活性的蛋白质,观察到效力的变化可能与细胞系的选择和/或培养条件有关。

[0463] 本申请人产生在ActRIIB的细胞外结构域中的一系列突变并生产作为细胞外ActRIIB和Fc结构域之间的可溶性融合蛋白的这些突变体蛋白。背景ActRIIB-Fc融合具有SEQ IDNO:40的序列。

[0464] 多种突变,包括N-和C-末端截短,被引入背景ActRIIB-Fc蛋白中。基于本文提出的数据,期望这些构建体,如果用TPA前导表达,将缺乏N-末端丝氨酸。突变在ActRIIB细胞外结构域经PCR诱变生成。在PCR后,通过Qiagen柱纯化片段,用SfoI和AgeI消化并凝胶纯化。这些片段被结合到表达载体pAID4中(见W02006/012627),以致在结合后,它创建了与人类IgG1的融合嵌合体,在转化为大肠杆菌DH5 $\alpha$ 后,取出菌落并分离DNAs。对于小鼠构建体(mFc)。用小鼠IgG2a代替人类IgG1。所有突变体的序列都被确认。

[0465] 所有的突变体通过瞬态转染在HEK293T细胞中生产。简言之,在一个500ml的旋转装置中,在250ml体积的Freestyle (Invitrogen) 培养基中设定 $6 \times 10^5$ 细胞/ml并生长过夜。次日,用DNA:PEI (1:1) 配合物,以0.5ug/ml最终DNA浓度处理这些细胞。在4小时后,加入250ml培养基并使细胞生长7天。条件培养基通过旋转沉淀细胞来收集并浓缩。

[0466] 使用各种技术,包括,例如蛋白A柱,并用低pH (3.0) 甘氨酸缓冲液洗脱纯化突变体。中和后,这些被针对PBS进行透析。

[0467] 通过类似的方法,也在CHO细胞中生产突变体。在WO 2008/097541和WO 2006/012627描述的结合分析和/或生物分析中测试突变体,所述文献通过参考并入本文。在一些情况下,用条件培养基而不是纯化蛋白进行分析。ActRIIB的额外的变体描述于美国专利号7,842,663中。

[0468] 申请人产生ActRIIB (25-131) -hFc融合蛋白,其包含具有N-末端和C-末端截短(天然蛋白SEQ ID NO:1的残基25-131)的人ActRIIB细胞外结构域,融合的N-末端用TPA前导序列代替天然ActRIIB前导,而融合的C-末端具有经由最小接头(3个甘氨酸残基)的人类Fc结构域(图16)。编码这种融合蛋白的核苷酸序列示于图17A和17B中。本申请人修饰密码子并发现编码ActRIIB (25-131) -hFc蛋白的不同的核酸,其提供了显著提高的初始转化体的表达水平(图18)。

[0469] 成熟的蛋白具有如下的氨基酸序列(N-末端由N-末端测序证实)(SEQ ID NO:78):  
ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVY  
FCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGG THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM  
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

[0470] 氨基酸1-107衍生自ActRIIB。

[0471] 表达的分子使用一系列柱色谱步骤,包括例如,3个或更多个以下步骤,以任何次序纯化:蛋白A色谱、Q琼脂糖凝胶色谱、苯基琼脂糖凝胶色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可用病毒过滤和缓冲液交换完成。

[0472] 几个配体对ActRIIB (25-131) -hFc及其全长对应物ActRIIB (20-134) -hFc的亲合力在体外用Biacore™仪器评价,而结果概述于下表中。由于配合物的极其快速的结合和分离,Kd值通过稳态亲和力拟合来获得,这阻止了 $k_{on}$ 和 $k_{off}$ 的准确测定。ActRIIB (25-131) -hFc以高亲和力结合激活素A、激活素B和GDF11。

[0473] ActRIIB-hFc形式的配体亲和力

|        | 融合构建体               | 激活素A<br>(e-11) | 激活素B<br>(e-11) | GDF11<br>(e-11) |
|--------|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| [0474] | ActRIIB(20-134)-hFc | 1.6            | 1.2            | 3.6             |
|        | ActRIIB(25-131)-hFc | 1.8            | 1.2            | 3.1             |

[0475] 实施例5:GDF诱捕剂的生成

[0476] 本申请人如下构建了GDF诱捕剂。具有ActRIIB(具有L79D取代的SEQ ID NO:1的氨基酸20-134)的修饰细胞外结构域的多肽大大地减少了相对于GDF11的激活素A结合和/或使肌肉生长抑制素(作为在SEQ ID NO:1的位置79的亮氨酸-对-天冬氨酸取代的结果)用其

间最小接头(3个甘氨酸氨基酸)融合于人类或小鼠Fc结构域。构建体被分别称为ActRIIB(L79D 20-134)-hFc和ActRIIB(L79D 20-134)-mFc。替代形式类似地用谷氨酸而非天冬氨酸在位置79进行(L79E)。还生成了用丙氨酸而不是谷氨酸在相对于以下的SEQ ID NO:44的位置226的替代形式并在所有方面进行了同等程度的测试。在位置79(相对于SEQ ID NO:1,或相对于SEQ ID NO:44的位置60)的天冬氨酸用以下的双下划线指示。在相对于SEQ ID NO:44的位置226的谷氨酸也用以下的双下划线指示。

[0477] GDF诱捕剂ActRIIB(L79D 20-134)-hFc作为从CHO细胞系纯化的(SEQ ID NO:44)在下文显示。

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT  
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
 [0478] FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS  
LSPGK

[0479] GDF诱捕剂的ActRIIB-衍生的部分具有在下面提出的氨基酸序列(SEQ ID NO:45),并且该部分可用作单体或者作为为单体、二聚体或更高级配合物的非-Fc融合蛋白。

[0480] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT(SEQ ID NO:45)

[0481] GDF诱捕剂蛋白在CHO细胞系中表达。考虑了3个不同的前导序列:

[0482] (i)蜂毒肽(melittin(HBML)),(ii)组织纤溶酶原激活剂(TPA),和(iii)天然。

[0483] 所选择的形式使用TPA前导并具有以下未经处理的氨基酸序列:MDAMKRGLCCVLLL  
CGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNC  
YDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:46)

[0484] 这种多肽由以下核酸序列编码(SEQ ID NO:47):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA  
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA  
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG  
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC  
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG  
 GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG  
 AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG  
 [0485] CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC  
 ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC  
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTTT CCCCCAAAA  
 CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT  
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG  
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC  
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG  
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG  
 TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA  
 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT  
 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG  
 [0486] AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC  
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA  
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG  
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0487] 纯化可通过一系列柱色谱步骤,包括例如3个或更多个以下步骤,以任何次序实现纯化:蛋白A色谱、Q琼脂糖凝胶色谱、苯基琼脂糖凝胶色谱、尺寸排阻色谱,和阳离子交换色谱。纯化可用病毒过滤和缓冲液交换完成。在纯化方案的实施例中,使细胞培养基通过蛋白A柱,以150mM Tris/NaCl (pH 8.0)洗涤,然后以50mM Tris/NaCl (pH 8.0)洗涤并用0.1M甘氨酸, pH 3.0洗脱。低pH洗脱液保持于室温下30分钟作为病毒清除的步骤。然后中和洗脱液并使之通过Q-琼脂糖凝胶离子交换柱并以50mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl洗涤,然后以含150mM和300mM之间的NaCl浓度的50mM Tris pH 8.0洗脱。然后将洗脱液改变为50mM Tris pH 8.0, 1.1M硫酸铵通过苯基琼脂糖凝胶柱、洗涤,并用含150和300mM之间的硫酸铵的50mM Tris pH 8.0洗脱。透析洗脱液并过滤待用。

[0488] 额外的GDF诱捕剂(修饰的ActRIIB-Fc融合蛋白,以减少激活素A结合相对于肌肉生长抑制素或GDF11结合的比率)描述于WO 2008/097541和WO 2006/012627中,通过参考并入本文。

[0489] 实施例6:GDF-11-和激活素-介导的信号传导的生物分析

[0490] A-204报道基因分析被用来评价ActRIIB-Fc蛋白和GDF诱捕剂对GDF-11和激活素A的信号传导的影响。细胞系:人类横纹肌肉瘤(源自肌肉)。报道基因载体:pGL3(CAGA)12(描述于Dennler et al, 1998, EMBO 17:3091-3100中)。CAGA12基序存在于TGF- $\beta$ 应答基因(如, PAI-1基因)中,因此这种载体具有通过SMAD2和3的因子信号传导的一般用途。

[0491] 第1天:将A-204细胞点样到48-孔板中。

[0492] 第2天:A-204细胞用10ug pGL3 (CAGA) 12或pGL3 (CAGA) 12 (10ug)+pRLCMV (1μg) 和Fugene转染。

[0493] 第3天:加入因子(稀释至培养基+0.1%BSA)。抑制剂在加入到细胞之前,需要与因子一起预培养1hr。6hrs后,用PBS冲洗细胞并溶胞。

[0494] 这之后接着荧光素酶分析。在任何抑制剂的不存在下,激活素A显示了10-倍刺激的报道基因表达和ED50~2ng/ml。GDF-11:16倍刺激,ED50:~1.5ng/ml。

[0495] 在这种分析中,ActRIIB (20-134) 是激活素A、GDF-8,和GDF-11活性的有效的抑制剂。如下文描述的,在这种分析中也测试了ActRIIB变体。

[0496] 实施例7:ActRIIB-Fc变体,基于细胞的活性

[0497] ActRIIB-Fc蛋白和GDF诱捕剂的活性如上所述在基于细胞的分析中测试。结果概述于下表。一些变体以不同C-末端截短构建体测试。如上所讨论的,5或15个氨基酸的截短造成活性的减少。GDF诱捕剂(L79D和L79E变体)显示了激活素A抑制的重大损失,同时保留了GDF-11的差不多的野生型抑制作用。

[0498] 可溶性ActRIIB-Fc结合于GDF11和激活素A:

|        | +++<br>良好(野生型)活性(约<br>$1 \times 10^{-8}$ K <sub>I</sub> )<br>++++<br>大于野生型<br>活性<br>ActRIIB-Fc<br>变体 | ActRIIB的部分(对应于<br>SEQ ID NO:1的氨基酸) | GDF11抑制活性                              | 激活素抑制活性                                |
|--------|--|------------------------------------|--|--|
|        | R64  | 20-134                             | +++<br>(约 $10^{-8}$ M K <sub>I</sub> ) | +++<br>(约 $10^{-8}$ M K <sub>I</sub> ) |
| [0499] | A64  | 20-134                             | +<br>(约 $10^{-6}$ M K <sub>I</sub> )   | +<br>(约 $10^{-6}$ M K <sub>I</sub> )   |
|        | R64  | 20-129                             | +++                                    | +++                                    |
|        | R64 K74A   | 20-134                             | ++++                                   | ++++                                   |
|        | R64 A24N   | 20-134                             | +++                                    | +++                                    |
|        | R64 A24N   | 20-119                             | ++                                     | ++                                     |
|        | R64 A24N<br>K74A   | 20-119                             | +                                      | +                                      |
|        | R64 L79P   | 20-134                             | +                                      | +                                      |
|        | R64 L79P<br>K74A   | 20-134                             | +                                      | +                                      |
|        | R64 L79D   | 20-134                             | +++                                    | +                                      |
|        | R64 L79E   | 20-134                             | +++                                    | +                                      |
|        | R64K   | 20-134                             | +++                                    | +++                                    |
|        | R64K   | 20-129                             | +++                                    | +++                                    |
|        | R64 P129S<br>P130A   | 20-134                             | +++                                    | +++                                    |
|        | R64N   | 20-134                             | +                                      | +                                      |

[0500] +活性差(约 $1 \times 10^{-6}$  K<sub>I</sub>)

[0501] ++中度活性(约 $1 \times 10^{-7}$  K<sub>I</sub>)

[0502] +++良好(野生型)活性(约 $1 \times 10^{-8}$  K<sub>I</sub>)

[0503] ++++大于野生型活性

[0504] 几种变体已在大鼠中对血清半衰期进行了评估。ActRIIB(20-134)-Fc具有大约70小时的血清半衰期。ActRIIB(A24N 20-134)-Fc具有大约100-150小时的血清半衰期。A24N变体具有基于细胞的分析(上文)的活性,且其等效于野生型分子。加上更长的半衰期,这意味着随着时间的推移,A24N变体将产生每单位蛋白比野生型分子更大的作用。以上测试的A24N变体,和任何其它变体可与GDF诱捕剂分子,例如L79D或L79E变体结合。

[0505] 实施例8:GDF-11和激活素A结合

[0506] 某些ActRIIB-Fc蛋白和GDF诱捕剂与配体的结合以Biacore™分析测试。

[0507] 使用抗-hFc抗体,在系统上捕获ActRIIB-Fc变体或野生型蛋白。注射配体并使之流过捕获的受体蛋白。结果概述于下表中。

[0508] 配体-结合特异性IIB变体

[0509]

| <b>GDF11</b>                     |                   |                   |               |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 蛋白                               | <b>Kon (1/Ms)</b> | <b>Koff (1/s)</b> | <b>KD (M)</b> |
| ActRIIB(20-134)-hFc              | 1.34e-6           | 1.13e-4           | 8.42e-11      |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc         | 1.21e-6           | 6.35e-5           | 5.19e-11      |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc         | 6.7e-5            | 4.39e-4           | 6.55e-10      |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc         | 3.8e-5            | 2.74e-4           | 7.16e-10      |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc         | 6.77e-5           | 2.41e-5           | 3.56e-11      |
| <b>GDF8</b>                      |                   |                   |               |
| 蛋白                               | <b>Kon (1/Ms)</b> | <b>Koff (1/s)</b> | <b>KD (M)</b> |
| ActRIIB(20-134)-hFc              | 3.69e-5           | 3.45e-5           | 9.35e-11      |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc         |                   |                   |               |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc         | 3.85e-5           | 8.3e-4            | 2.15e-9       |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc         | 3.74e-5           | 9e-4              | 2.41e-9       |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc         | 2.25e-5           | 4.71e-5           | 2.1e-10       |
| ActRIIB(R64K 20-129)-hFc         | 9.74e-4           | 2.09e-4           | 2.15e-9       |
| ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc | 1.08e-5           | 1.8e-4            | 1.67e-9       |
| ActRIIB(K74A 20-134)-hFc         | 2.8e-5            | 2.03e-5           | 7.18e-11      |
| <b>激活素A</b>                      |                   |                   |               |
| 蛋白                               | <b>Kon (1/Ms)</b> | <b>Koff (1/s)</b> | <b>KD (M)</b> |
| ActRIIB(20-134)-hFc              | 5.94e6            | 1.59e-4           | 2.68e-11      |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc         | 3.34e6            | 3.46e-4           | 1.04e-10      |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc         |                   |                   | 低结合           |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc         |                   |                   | 低结合           |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc         | 6.82e6            | 3.25e-4           | 4.76e-11      |
| ActRIIB(R64K 20-129)-hFc         | 7.46e6            | 6.28e-4           | 8.41e-11      |
| ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc | 5.02e6            | 4.17e-4           | 8.31e-11      |

[0510] 在无细胞分析中获得的这些数据证实了基于细胞的分析数据,显示A24N变体保留类似于ActRIIB(20-134)-hFc分子的配体-结合活性和L79D或L79E分子保留肌肉生长抑制素和GDF11结合,但显示了显著降低的(未可定量)与激活素A的结合。

[0511] 已生成其它变体,并如在W02006/012627(其全文通过参考并入本文)中报道的进行测试。见例如,59-60页,使用连接于装置的配体并使受体流过连接的配体。显著地,K74Y、K74F、K74I(并假设在K74的其它疏水性取代,例如K74L),和D80I,导致激活素A(ActA)结合于GDF11结合相对于野生型K74分子的比率的降低。表中关于这些变体的数据转载如下:

[0512] 结合于GDF11和激活素A的可溶性ActRIIB-Fc变体(Biacore™分析)

| ActRIIB     | ActA                  | GDF11                 |
|-------------|-----------------------|-----------------------|
| WT<br>(64A) | KD=1.8e-7M<br>(+)     | KD= 2.6e-7M<br>(+)    |
| WT (64R)    | na                    | KD= 8.6e-8M<br>(+++)  |
| +15尾        | KD ~2.6 e-8M<br>(+++) | KD= 1.9e-8M<br>(++++) |
| E37A        | *                     | *                     |
| R40A        | -                     | -                     |
| D54A        | -                     | *                     |
| K55A        | ++                    | *                     |
| R56A        | *                     | *                     |
| K74A        | KD=4.35e-9 M<br>+++++ | KD=5.3e-9M<br>+++++   |
| [0513] K74Y | *                     | --                    |
| K74F        | *                     | --                    |
| K74I        | *                     | --                    |
| W78A        | *                     | *                     |
| L79A        | +                     | *                     |
| D80K        | *                     | *                     |
| D80R        | *                     | *                     |
| D80A        | *                     | *                     |
| D80F        | *                     | *                     |
| D80G        | *                     | *                     |
| D80M        | *                     | *                     |
| D80N        | *                     | *                     |
| D80I        | *                     | --                    |
| F82A        | ++                    | -                     |

[0514] \*未观察到结合

[0515] --<1/5WT结合

[0516] -~1/2WT结合

[0517] +WT

[0518] ++<2x结合增加

[0519] +++~5x结合增加

[0520] ++++~10x结合增加

[0521] +++++~40x结合增加

[0522] 实施例9:含截短的ActRIIB细胞外结构域的GDF诱捕剂的生成

[0523] 称为ActRIIB(L79D 20-134)-hFc的GDF诱捕剂通过TPA前导与ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基20-134)的N-末端融合生成,所述细胞外结构域含有一个亮氨酸-至-天冬氨酸取代(在SEQ ID NO:1中的残基79)和具有最小接头(3个甘氨酸残基)的人类Fc结构域的C-末端融合(图5)。对应于这种融合蛋白的核苷酸序列示于图6A和6B中。

[0524] 具有截短的ActRIIB细胞外结构域的、称为ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的GDF诱捕剂通过TPA前导与截短细胞外结构域(在SEQ ID NO:1中的残基25-131)的N-末端融合生成,所述细胞外结构域含有一个亮氨酸-至-天冬氨酸取代(在SEQ ID NO:1中的残基79)和具有

最小接头(3个甘氨酸残基)的人类Fc结构域的C-末端融合(图7, SEQ ID NO:61)。经处理形式的ActRIIB(L79D 25-131)-hFc(SEQ ID NO:64)示于图9中。一个编码这个融合蛋白的核苷酸序列示于图8A和8B(SEQ ID NO:62),而准确编码相同融合蛋白的替代核苷酸序列示于图11A和11B(SEQ ID NO:66)中。

[0525] 实施例10:通过含双-截短的ActRIIB细胞外结构域的GDF诱捕剂的选择性配体结合

[0526] GDF诱捕剂和其它ActRIIB-hFc蛋白对几种配体的亲和力用Biacore™设备体外评价。结果概述于下表中。由于配合物的极其快速的结合和分离, Kd值通过稳态亲和力拟合来获得,其阻止了 $k_{on}$ 和 $k_{off}$ 的准确测定。

[0527] ActRIIB-hFc变体的配体选择性:

|        | 融合构建体                    | 激活素A<br>(Kd e-11) | 激活素B<br>(Kd e-11) | GDF11<br>(Kd e-11) |
|--------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| [0528] | ActRIIB(L79 20-134)-hFc  | 1.6               | 1.2               | 3.6                |
|        | ActRIIB(L79D 20-134)-hFc | 1350.0            | 78.8              | 12.3               |
|        | ActRIIB(L79 25-131)-hFc  | 1.8               | 1.2               | 3.1                |
|        | ActRIIB(L79D 25-131)-hFc | 2290.0            | 62.1              | 7.4                |

[0529] 具有截短细胞外结构域、ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的GDF诱捕剂,等于或超过了由较长变体,ActRIIB(L79D 20-134)-hFc,所显示的配体选择性,后者具有与缺乏L79D取代的ActRIIB-hFc对应物比较的激活素A结合的明显损失,激活素B结合的部分损失,和GDF11结合的几乎完全保留。注意到单独截短(无L79D取代)不改变在此展示的配体中的选择性[ActRIIB(L7925-131)-hFc与ActRIIB(L7920-134)-hFc比较]。ActRIIB(L79D 25-131)-hFc也保留对Smad 2/3信号传导配体GDF8和Smad 1/5/8配体BMP6和BMP10的强烈至中度的结合。

[0530] 实施例11:衍生自ActRIIB5的GDF诱捕剂

[0531] 其他人报道了一种可替代的、可溶性形式的ActRIIB(指定为ActRIIB5),其中外显子4,包括ActRIIB跨膜结构域,已被不同的C-末端序列替代(见例如,WO 2007/053775)。

[0532] 没有其前导的天然人ActRIIB5的序列如下:

[0533] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

[0534] KGCWLD<sup>DD</sup>FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHE(SEQ ID NO:48)

[0535] 亮氨酸-与-天冬氨酸取代,或其它酸性取代,可如所述在天然位置79(下划线的)进行,以构建变体ActRIIB5(L79D),其具有以下序列:

[0536] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

[0537] KGCWDD<sup>DD</sup>FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHE(SEQ ID NO:49)

[0538] 这个变体可用TGGG接头(单下划线)连接于人类Fc(双下划线),生成具有以下序列的人ActRIIB5(L79D)-hFc融合蛋白:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
 KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
 TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
 [0539] FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)

[0540] 这个构建体可在CHO细胞中表达。

[0541] 实施例12: 在小鼠MDS模型中, GDF诱捕剂对无效的红细胞生成和贫血的影响本申请人研究了GDF诱捕剂ActRIIB(L79D 25-131)-mFc在MDS的NUP98-HOXD13小鼠模型中的作用, 其以失败的前体成熟和无效的造血作用为特征。在这个模型中, 疾病严重程度随着年龄而增加, 最终在大多数小鼠中发展为急性骨髓性白血病, 且它们具有大约14个月的平均寿命。在大约4月龄时开始, 这些小鼠显示出贫血、白血球减少症、无效的红细胞生成, 和为正常细胞到超细胞的骨髓[Lin et al. (2005) Blood 106:287-295]。为监测长期施用的影响, 用ActRIIB(L79D 25-131)-mFc(10mg/kg, s.c.)或媒介每周两次治疗MDS小鼠, 在大约4月龄时开始并持续7个月, 同时收集基线和每月的血液样本(50 $\mu$ L), 此后完成血液计数分析。如所预期的, 与野生型小鼠比较, 6月龄的MDS小鼠发生重度贫血(图13A), 和骨髓分析揭示, 与年龄匹配的FVB野生型小鼠, MDS小鼠的红细胞前体数量增加(图13A)和骨髓/幼红细胞系(M/E)比率降低[Suragani et al. (2014) Nat Med 20:408-414], 指示无效的红细胞生成。在6月龄MDS小鼠中, 用ActRIIB(L79D 25-131)-mFc治疗显著地增加RBC计数(16.9%)和血红蛋白浓度(12.5%)(图13A), 减少骨髓中红细胞前体的细胞计数(图13A), 并使M/E比率标准化至野生型小鼠[Suragani et al. (2014) Nat Med 20:408-414]。

[0542] 与媒介比较, 在12月龄的MDS小鼠中, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc治疗显著地增加RBC计数(18.3%)和血红蛋白水平(13.0%)(图13B), 减少红细胞前体的细胞计数(图13B), 并改进M:E比率[Suragani et al. (2014) Nat Med 20:408-414]。ActRIIB(L79D 25-131)-mFc治疗不影响骨髓前体绝对数量。流式细胞术证实, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc治疗减少两个年龄的MDS小鼠的幼红细胞系增殖。一项在用ActRIIB(L79D 25-131)-mFc治疗7个月的MDS小鼠中的时间过程分析显示在研究期间RBC数量持续升高[Suragani et al. (2014) Nat Med 20:408-414]。总之, 这些结果指示, 用GDF诱捕剂治疗改善MDS小鼠的贫血、幼红细胞系增殖和无效的红细胞生成, 而不管疾病的严重程度。

[0543] 实施例13: MDS患者的细胞学和遗传特征对GDF诱捕剂的治疗反应

[0544] 一种含有修饰的激活素受体IIB型和IgG Fc的重组融合蛋白[ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, 也称为luspatercept或ACE-536], 正被开发用于治疗因无效的红细胞生成如骨髓增生异常综合征(MDS)所致的贫血。MDS患者常常具有升高的EPO水平并可能对促红细胞生成-刺激药物(ESAs)没有反应或难以治疗。MDS患者也已显示增加GDF11的血清水平

[Suragani et al. (2014) Nat Med 20:408-414] 和增加骨髓中的Smad 2/3信号传导[Zhou et al. (2008) Blood 112:3434-3443]。ActRIIB (L79D 25-131) -hFc结合TGF $\beta$ 超家族的配体,包括GDF11,抑制Smad2/3信号传导,并经由不同于ESAs的机制促进晚期幼红细胞系分化。一种小鼠版本,ActRIIB (L79D 25-131) -mFc,在小鼠MDS模型中减少Smad2信号传导,增加血红蛋白(Hb)水平,并降低骨髓幼红细胞系增殖[Suragani et al. (2014) Nat Med 20:408-414]。在健康-志愿者研究中,ActRIIB (L79D 25-131) -hFc是完全可耐受的并增加Hb水平[Attie et al. (2014) Am J Hematol 89:766-770]。

[0545] 本申请人正在进行一项持续的、2期、多中心的、开放标签的、剂量-调查的研究,以评价ActRIIB (L79D 25-131) -hFc对贫血患者的影响,具有或者高的输血负担(HTB,定义为 $\geq 4$ 单位RBC,在基线前经8周)或者低的输血负担(LTB,定义为 $< 4$ 单位RBC,在基线前经8周)的患者具有低或Int-1危险MDS。研究结果包括幼红细胞系反应(或者在LTB患者中Hb增加,或者在HTB患者中输血负担减少)、安全性、耐受性、药代动力学,和药效学生物标志物。准入标准包括:低或Int-1危险MDS、年龄 $\geq 18$ 岁、贫血(定义为或者为HTB患者或者具有基线Hb $< 10.0$ g/dL的LTB患者)、EPO $> 500$ U/L或对ESAs无反应/难以治疗、以前没有用阿扎胞苷或地西他滨治疗,和目前没有用ESA、粒细胞集落-刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子(GM-CSF),或来那度胺、沙利度胺或泊马度胺治疗。在剂量升级阶段,ActRIIB (L79D 25-131) -hFc通过皮下注射施用,每3周1次,在剂量水平0.125、0.25、0.5、0.75、1.0、1.33和1.75mg/kg的7个连续组(n=3-6)中,至多5个剂量,持续3-个月的随访。

[0546] 可获得26个患者(7个LTB/19个HTB)的数据。平均年龄是71岁(范围:27-88岁),50%是女性,54%先前曾接受EPO疗法,和15%先前曾接受来那度胺。按WHO亚型分类的患者分类如下:15%RARS,46%RCMD-RS,15%RCMD,15%RAEB-1(包括两个具有 $\geq 15\%$ 环形铁粒幼细胞的患者)和8%del(5q)。对于LTB患者(n=7)的平均(SD)基线Hgb是9.1(0.4)g/dL。在治疗前8周输血的平均(SD)单位RBC对于LTB患者是0.9(1.1)单位,而对于HTB患者是6.3(2.4)单位。与基线比较,7个LTB患者中的2个经8周具有增加的平均Hb $\geq 1.5$ g/dL。在0.125(n=1)、0.25(n=1)、0.75(n=3)和1.75(n=2)mg/kg剂量组中的LTB患者的平均最大Hb增加分别是0.8、1.0、2.2、3.5g/dL。在研究其间,7个LTB患者中的6个实现RBC输血独立(RBC-TI),持续 $\geq 8$ 周。范围从0.75mg/kg至1.75mg/kg的剂量水平被认为是活性剂量。在活性的剂量组的5个患者中,4个(80%)达到 $\geq 1.5$ g/dl的Hgb增加的预定终点 $\geq 2$ 周。获得HI-E反应[国际工作组(International Working Group);Cheson et al. (2000) Blood 96:3671-3674;Cheson et al. (2006) Blood 108:419-425]的2个患者(40%),被定义为LTB患者的Hgb增加 $\geq 1.5$ g/dl,持续 $\geq 8$ 周。在HTB患者中,HI-E反应被定义为与在研究开始之前8周比较,输血负担在8周期间减少至少4个单位的红细胞输血。在活性的剂量组中,12个(42%)HTB患者中的5个满足在治疗期间的8-周时间间隔与在治疗前8周比较的减少 $\geq 4$ RBC单位或RBC单位输血 $\geq 50\%$ 减少的预定终点,和相同患者(12个中的5个,42%)获得HI-E反应;在活性的剂量组的12个HTB患者中的4个(25%)在研究期间实现RBC-TI $\geq 8$ 周。在研究药物施用后,在一些患者中观察到嗜中性粒细胞计数增加。最后,ActRIIB (L79D 25-131) -hFc一般是良好耐受的。到目前为止,没有报告相关的严重不利事件。不管因果关系,大多数频繁的不利事件是:腹泻(n=4,1/2级)、骨痛、疲劳、肌肉痉挛、肌痛和鼻咽炎(各自n=3,1/2级)。

[0547] 骨髓吸出物的评估表明在活性剂量组(0.75-1.75mg/kg)中存在环形铁粒幼细胞

(如果 $\geq 15\%$ 的红细胞前体显示出环形铁粒幼细胞形态,则认为阳性)和对ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的反应性之间的关联。LTB和HTB二种患者的总反应率(使用HI-E标准,在上文描述)是7/17(41%)。在基线环形铁粒幼细胞呈阳性反应的患者中,7/13(54%)患者获得HI-E反应,且值得注意的是,这4名对基线处的环形铁粒幼细胞呈阴性的患者中没有一人获得HI-E反应。

[0548] 来自患者的骨髓吸出物也被评价突变在21个已知藏匿MDS相关突变(主要是体细胞突变)的不同基因中的存在。从骨髓吸出物中分离基因组DNA,选择的21基因的编码区通过聚合酶链反应扩增,这些区的DNA序列是用下一代测序测定的(Myeloid Molecular Profile21-gene panel,Genoptix,Inc.,Carlsbad,Ca)。这种分析检查激活的信号传导基因(KIT、JAK2、NRAS、CBL,和MPL)、转录因子(RUNX1、ETV6)、表观遗传基因(IDH1、IDH2、TET2、DNMT3A、EZH2、ASXL1,和SETBP1)、RNA剪接基因(SF3B1、U2AF1、ZRSF2,和SRSF2),和肿瘤抑制剂/其它(TP53、NPM1、PHF6)。SF3B1的分析特异性地靶向外显子13-16。在这些21个MDS-相关的基因的评价中,在有反应的患者比无反应的患者骨髓细胞更频繁地检测出SF3B1的突变。在这些患者中检测的各个SF3B1突变显示于下表。相同的突变有时发生于多个患者中。

[0549]

| 核苷酸  | 核苷酸取代 | 氨基酸取代 | 外显子 |
|------|-------|-------|-----|
| 1873 | C→T   | R625C | 14  |
| 1874 | G→T   | R625L | 14  |
| 1986 | C→G   | H662Q | 14  |
| 2098 | A→G   | K700E | 15  |
| 2342 | A→G   | D781G | 16  |

[0550] 在活性剂量组的SF3B1突变患者中,9个中的6个(67%)获得HI-E反应,包括所有3例获得输血独立大于8周的患者。在不具有SF3B1突变的患者中,8个中只有一个(13%)获得HI-E反应。在具有环形铁粒幼细胞的MDS患者中频繁观察到SF3B1中的突变且与无效的红细胞生成相关。

[0551] 这些结果指示,显示 $\geq 15\%$ 环形铁粒幼细胞(和具有其它形式的铁粒幼细胞性贫血的患者)和/或至少一种SF3B1突变的MDS患者比具有 $< 15\%$ 环形铁粒幼细胞和/或SF3B1中没有突变的MDS患者更可能对ActRIIB(L79D 25-131)-hFc行为做出治疗反应。基于这些数据,期望任何这些患者亚组的选择性治疗大大地增加用ActRII抑制剂治疗的利益/风险比。

[0552] 实施例14:对GDF诱捕剂有治疗反应的MDS患者的视觉敏锐度的提高还观察到ActRIIB(L79D 25-131)-hFc治疗具有对视力的令人惊奇的效果。在上述的2期MDS研究中,显示视力差的男性患者(如,需要矫正晶状体来进行某些活动)对ActRIIB(L79D 25-131)-hFc疗法有反应。在治疗前所述患者罹患慢性贫血、需要定期输血。ActRIIB(L79D 25-131)-hFc导致患者的血红蛋白水平的显著和持续增加。确实,所述患者在研究期间实现输血独立 $\geq 8$ 个月。此外,在患者中观察到视力的显著改善。事实上,所述患者不再需要矫正晶状体来执行某些活性。因此,这些数据指示,除了对治疗贫血的积极作用,ActRII抑制剂还可被用来提高MDS患者的视力。此外,鉴于对如下讨论的MDS-相关视力损失所报道的机制,数据提示ActRII抑制剂也可对治疗其它类型的眼睛疾患具有积极作用。

[0553] 已报道在患有多种血液学疾病,特别是与贫血相关的那些血液学疾病的患者,视网膜神经纤维层厚度降低[Han et al. (2015) J Glaucoma(先于纸质印刷的电子文档公

布) ]。视网膜神经纤维中的这样的改变与视力降低和眼睛的其它病理学改变相关。研究指示这些患者中的视网膜损伤可能是由于缺血性视神经病变所致。例如, MDS患者的视力损失与NAION的临床表现相关[Brouzas et al. (2009) *Clinical Ophthalmology* 3:133-137]。在这样的MDS患者中, 相信NAION的开始是通过缺血和/或微血管供血不足的机制。确实, 已显示用于治疗缺血-缺氧的疗法提高MDS患者的视觉敏锐度。因此, 本申请的数据提示ActRII拮抗剂可被用来治疗其它相关的眼睛疾患, 特别是与缺血和微血管功能不足相关的那些眼疾。

[0554] 实施例15: 在激光-诱导的脉络膜新血管化后ActRII多肽对损伤尺寸和渗漏的影响在激光-诱导的脉络膜新血管化的大鼠模型中, 评估ActRIIA-Fc (见实施例1)、ActRIIB-Fc (见实施例4) 和ActRIIB(L79D 25-131)-Fc (见实施例9) 对损伤尺寸和渗漏的影响。

[0555] 在研究1天后, 使20只挪威褐鼠 (6-8周龄) 接受双侧激光处理以在每只眼睛产生3处损伤。用1% 盐酸环戊醇胺酯 (Cyclogyl) 溶液使动物扩瞳并避免光照。在可观察到的扩瞳后, 给动物镇静剂。观察镇静动物的眼底并使用微米IV小型动物眼底镜 (Micron IV small animal funduscope) (Phoenix Research) 记录。使用通过微米IV定制激光附件连接的热激光进行激光处理。每只眼睛的总共三个损伤用532nm的波长放置在右眼上。记录和评价产生的眼底图像, 确认激光已成功地通过布鲁奇膜 (Bruch's membrane) 产生了气泡。

[0556] 激光治疗后, 大鼠被分开到四个治疗组之一: a) 在1、8和15天s.c. 施用媒介 (PBS); b) 在1、8和15天s.c. 施用ActRIIA-Fc (10mg/kg); c) 在1、8和15天s.c. 施用ActRIIB-Fc (10mg/kg); 和d) 在1、8和15天s.c. 施用ActRIIB(L79D 25-131)-Fc (10mg/kg)。

[0557] 在第22天, 通过体内荧光素血管造影对大鼠的损伤尺寸和渗漏程度进行评估。麻醉动物, 然后接受IP注射10% 荧光素钠 (1 $\mu$ l/g体重)。然后使用Micron III和激励器/隔离滤波器 (488nm的目标波长) 将眼底图像捕获为8-bit的TIFF文件。也获得每只眼睛的标准彩色眼底照片。所有TIFF图像使用计算机图像-分析软件 (如, ImageJ, NIH, USA) 量化。然后对损伤的边界进行单独的无束缚追踪, 并且对生成的图像进行了多Otsu阈值化, 以消除背景信号并以像素为单位量化区域。从分析排除出血区或两个损伤重叠的区域。

[0558] 实施例16: 在链脲菌素-诱导的糖尿病模型的大鼠模型中ActRII多肽对损伤尺寸和渗漏的影响在链脲菌素 (STZ) 诱导的糖尿病的大鼠模型中, 评估ActRIIA-Fc (见实施例1)、ActRIIB-Fc (见实施例4) 和ActRIIB(L79D 25-131)-Fc (见实施例9) 对损伤尺寸和渗漏的影响。

[0559] 在系统施用后, STZ是一种会导致胰岛细胞的衰竭的小分子。胰岛细胞死亡造成胰岛素生产损失和随后的血糖水平失调, 在几天内导致高血糖。这个模型已被用来研究炎症、血管病变, 和在糖尿病性视网膜病变和糖尿病性黄斑水肿的发病机理中的信号传导途径。在用STZ诱导糖尿病后8周, 存在视觉敏锐度和对比度敏感性的显著和进行性下降。由于被监管机构接受用于人体临床试验的主要终点聚焦在视觉敏锐度和对比度敏感性的定量测量上, 这是测试治疗剂预防糖尿病性视力损失的活性的最佳模型在研究的第1天, 对20只挪威褐鼠 (8-12周龄) 给予单次腹腔内注射STZ (50mg/kg体重在10mmol/L柠檬酸盐缓冲液中, pH 4.5)。在STZ注射后2天检查血糖水平, 此后每周1次。只有血糖水平高于350mg/dl的动物将被用作糖尿病大鼠。

[0560] STZ治疗后6-8周, 将大鼠分开到4个治疗组之一中: a) 在1、8和15天s.c. 施用媒介

(PBS) ;b) 在1、8和15天s.c.施用ActRIIA-Fc (10mg/kg) ;c) 在1、8和15天s.c.施用ActRIIB-Fc (10mg/kg) ;和d) 在1、8和15天s.c.施用ActRIIB(L79D 25-131) -Fc (10mg/kg) 。

[0561] 在治疗开始后第22天,如以上在实施例15中所述,通过体内荧光素血管造影对大鼠的损伤尺寸和渗漏的减少进行评估。

[0562] 通过参考并入

[0563] 本文提及的所有出版物和专利通过引用以其全文并入本文,如同各个单独的出版物和专利特别地和单独地指明通过引用并入本文一样。

[0564] 虽然已经讨论了本主题的特定实施方案,以上说明书是示例性的而不是限制性的。许多变化将在本领域技术人员审查本说明书和下面的权利要求书时变得显而易见。本发明的全部范围应通过参考权利要求书,以及它们的全部等同范围,和说明书,连同这样的变化来确定。

## 序列表

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> 治疗眼睛疾病的方法

<130> 1848179-0002-092-101

<140> 15/360, 588

<141> 2016-11-23

<150> 62/258, 934

<151> 2015-11-23

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001]

```

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1           5           10           15
Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
           20           25           30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
           35           40           45
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50           55           60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65           70           75           80
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
           85           90           95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
           100          105          110
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
           115          120          125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
           130          135          140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
145          150          155          160
Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
           165          170          175
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
           180          185          190
Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
           195          200          205
Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
           210          215          220
Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
225          230          235          240

```

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn  
 245 250 255  
 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser  
 260 265 270  
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys  
 275 280 285  
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp  
 290 295 300  
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg  
 305 310 315 320  
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val  
 325 330 335  
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro  
 340 345 350  
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu  
 355 360 365  
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile  
 370 375 380  
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys  
 385 390 395 400  
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu  
 405 410 415  
 [0002] Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val  
 420 425 430  
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp  
 450 455 460  
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu  
 465 470 475 480  
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu  
 485 490 495  
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
 500 505 510  
 <210> 2  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 2  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
 20 25 30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn



|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
|        | 100   | 105 | 110 |
|        | Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro |     |     |
|        | 115   | 120 | 125 |
|        | Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu |     |     |
|        | 130   | 135 | 140 |
|        | Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr |     |     |
|        | 145   | 150 | 155 |
|        | Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro |     |     |
|        | 165   | 170 | 175 |
|        | Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu |     |     |
|        | 180   | 185 | 190 |
|        | Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln |     |     |
|        | 195   | 200 | 205 |
|        | Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys |     |     |
|        | 210   | 215 | 220 |
|        | Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys |     |     |
|        | 225   | 230 | 235 |
|        | His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn |     |     |
|        | 245   | 250 | 255 |
|        | Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser |     |     |
|        | 260   | 265 | 270 |
|        | Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys |     |     |
|        | 275   | 280 | 285 |
| [0004] | His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp |     |     |
|        | 290   | 295 | 300 |
|        | Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg |     |     |
|        | 305   | 310 | 315 |
|        | Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val |     |     |
|        | 325   | 330 | 335 |
|        | Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro |     |     |
|        | 340   | 345 | 350 |
|        | Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu |     |     |
|        | 355   | 360 | 365 |
|        | Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile |     |     |
|        | 370   | 375 | 380 |
|        | Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys |     |     |
|        | 385   | 390 | 395 |
|        | Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu |     |     |
|        | 405   | 410 | 415 |
|        | Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val |     |     |
|        | 420   | 425 | 430 |
|        | His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro |     |     |
|        | 435   | 440 | 445 |
|        | Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp |     |     |
|        | 450   | 455 | 460 |
|        | Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu |     |     |

465                    470                    475                    480  
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu  
                                  485                    490                    495  
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
                                  500                    505                    510  
 <210> 5  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 5  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1                                    5                                    10                                    15  
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
                                  20                                    25                                    30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser  
                                  35                                    40                                    45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn  
                                  50                                    55                                    60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65                                    70                                    75                                    80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
                                  85                                    90                                    95  
 [0005] Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
                                  100                                    105                                    110  
 Ala Pro Thr  
                                  115  
 <210> 6  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 6  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1                                    5                                    10                                    15  
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
                                  20                                    25                                    30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser  
                                  35                                    40                                    45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn  
                                  50                                    55                                    60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65                                    70                                    75                                    80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
                                  85                                    90                                    95  
 Leu Pro Glu Ala  
                                  100  
 <210> 7

|   |      |
|---|------|
| <211> 1536  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> 智人  |      |
| <400> 7   |      |
| atgacggcgc cctgggtggc cctcgcctc ctctggggat cgctgtgcgc cggctctggg    | 60   |
| cgtagggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc    | 120  |
| accaaccaga gcgccctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggt gactgctac     | 180  |
| gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggtg ctggctagat    | 240  |
| gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccaggtgtac   | 300  |
| ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gaacgctca ctcatattgcc agaggctggg   | 360  |
| ggcccgggaag tcactgacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc  | 420  |
| tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttgatgtac    | 480  |
| cggcatcga agcccccta cggctcatgt gacatccatg aggaccctgg gcctccacca     | 540  |
| ccatccccctc tggtagggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc | 600  |
| tttgctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttcca     | 660  |
| ctccaggaca agcagctcgt gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag    | 720  |
| cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcag gctccaacct cgaagtagag    | 780  |
| ctgtggctca tcacggcctt ccattgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac  | 840  |
| atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg ccttcatac    | 900  |
| ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg   | 960  |
| gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt   | 1020 |
| ggcttggtg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacgg acaggtaggc     | 1080 |
| acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc   | 1140 |
| ttctcgcga ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc     | 1200 |
| aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag   | 1260 |
| cacccttctg tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt    | 1320 |
| aaagatcaact ggttgaacaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc    | 1380 |
| tgggacctg atgcagaggc tcgcttgcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg     | 1440 |
| attcggaggt cggtaacgg cactacctc gactgtctc tttccctggt gacctctgtc      | 1500 |
| accaatgtgg acctgcccc taaagatgta agcatc                              | 1536 |
| <210> 8   |      |
| <211> 345   |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> 智人  |      |
| <400> 8   |      |
| ggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag    | 60   |
| cgcaccaacc agagcggcct ggagcgtgc gaagcgcagc aggacaagcg gctgactgc     | 120  |
| tacgcctcct ggcgaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaagg ctgctggcta     | 180  |
| gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccagtg    | 240  |
| tacttctgct gctgtgaagg caacttctg aacgaacgct tcaactcatt gccagaggct    | 300  |
| ggggccccgg aagtcacgta cgagccacc cgcacagccc ccacc                    | 345  |
| <210> 9   |      |
| <211> 513   |      |
| <212> PRT   |      |
| <213> 智人  |      |
| <400> 9   |      |

[0006]



Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg  
 370 375 380  
 Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg  
 385 390 395 400  
 Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu  
 405 410 415  
 Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val  
 420 425 430  
 Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His  
 435 440 445  
 Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His  
 450 455 460  
 Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr  
 465 470 475 480  
 Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr  
 485 490 495  
 Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser  
 500 505 510  
 Leu

[0008]

<210> 10  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 10  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
 100 105 110  
 Lys Pro Pro  
 115  
 <210> 11  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
 Phe Pro Glu Met  
 100

<210> 12

<211> 1539

<212> DNA

<213> 智人

<400> 12

[0009]

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60  
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120  
 agaaccaate aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180  
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaaggg ttgttggtgctg 240  
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300  
 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccggagatg 360  
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaacg caccctatta caacatcctg 420  
 ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480  
 tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540  
 cccccacct ctccattact aggtttgaaa ccaactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600  
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660  
 tttccaatac aggacaaaca gtcattgcaa aatgaatacg aagtctacag ttgacctgga 720  
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780  
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840  
 gctaattgtg tctcttgtaa tgaactgtgt catattgcag aaacctatgc tagaggattg 900  
 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960  
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgtgac 1020  
 tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataccca tggacaggtt 1080  
 ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140  
 gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200  
 tgtactgctg cagatggacc ttagatgaa tacatgttgc cttttgagga ggaaattggc 1260  
 cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctggt 1320  
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380  
 tgttgggatac acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtagggtg aagaattacc 1440  
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500  
 gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tetagteta 1539  
 <210> 13

<211> 345  
 <212> DNA  
 <213> 智人  
 <400> 13  
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60  
 agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120  
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaaggg ttggttgctg 180  
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacac ccctgaagta 240  
 tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccggagatg 300  
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaage caccc 345  
 <210> 14  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 14  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 20 25 30  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 35 40 45  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 50 55 60  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 65 70 75 80  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 85 90 95  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 100 105 110  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 115 120 125  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 165 170 175  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 180 185 190  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 195 200 205  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 210 215 220  
 Lys  
 225  
 <210> 15

[0010]

<211> 223  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 15  
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 1                   5                   10                   15  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
                   20                   25                   30  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
                   35                   40                   45  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
                   50                   55                   60  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 65                   70                   75                   80  
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
                   85                   90                   95  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
                   100                   105                   110  
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
                   115                   120                   125  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
                   130                   135                   140  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
                   165                   170                   175  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
                   180                   185                   190  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
                   195                   200                   205  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                   210                   215                   220  
 <210> 16  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 16  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
                   20                   25                   30  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
                   35                   40                   45  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val  
                   50                   55                   60  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

[0011]



Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg  
 165 170 175  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 180 185 190  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 195 200 205  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn  
 210 215 220  
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser  
 245 250 255  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser  
 260 265 270  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 275

<210> 18  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 18

[0013]

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
|   | 195 | 200 | 205 |
| Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Leu Ser Leu Gly Lys   |     |     |     |
| 225   |     |     |     |
| <210> 19  |     |     |     |
| <211> 3   |     |     |     |
| <212> PRT   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 人工序列的描述: 合成   |     |     |     |
| 肽   |     |     |     |
| <400> 19  |     |     |     |
| Gly Gly Gly   |     |     |     |
| 1   |     |     |     |
| <210> 20  |     |     |     |
| <211> 4   |     |     |     |
| <212> PRT   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 人工序列的描述: 合成   |     |     |     |
| 肽   |     |     |     |
| <400> 20  |     |     |     |
| Gly Gly Gly Gly   |     |     |     |
| 1   |     |     |     |
| <210> 21  |     |     |     |
| <211> 5   |     |     |     |
| <212> PRT   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 人工序列的描述: 合成   |     |     |     |
| 肽   |     |     |     |
| <400> 21  |     |     |     |
| Thr Gly Gly Gly Gly   |     |     |     |
| 1   | 5   |     |     |
| <210> 22  |     |     |     |
| <211> 5   |     |     |     |
| <212> PRT   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 人工序列的描述: 合成   |     |     |     |
| 肽   |     |     |     |
| <400> 22  |     |     |     |
| Ser Gly Gly Gly Gly   |     |     |     |
| 1   | 5   |     |     |
| <210> 23  |     |     |     |

[0014]

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
     肽  
 <400> 23  
 Thr Gly Gly Gly  
 1  
 <210> 24  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
     肽  
 <400> 24  
 Ser Gly Gly Gly  
 1  
 <210> 25  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 [0015] <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
     肽  
 <400> 25  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1                    5  
 <210> 26  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 26  
 Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys  
                     20                    25                    30  
 Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr  
                     35                    40                    45  
 Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser  
                     50                    55                    60  
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu  
                     85                    90                    95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn  
 100 105 110  
 Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys  
 115 120 125  
 Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala  
 130 135 140  
 Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys  
 180 185 190  
 Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly  
 195 200 205  
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr  
 210 215 220  
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile  
 225 230 235 240  
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys  
 245 250 255  
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu  
 260 265 270  
 [0016] Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn  
 275 280 285  
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser  
 290 295 300  
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe  
 325 330 335  
 Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp  
 340  
 <210> 27  
 <211> 317  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 27  
 Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys  
 20 25 30  
 Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr  
 35 40 45  
 Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser  
 50 55 60  
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile



<212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 29  
 Glu Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met  
 1                   5                   10                   15  
 Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val  
                   20                   25  
 <210> 30  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 30  
 Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr  
                   20                   25  
 <210> 31  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 31  
 Met Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Trp Pro Leu Pro Trp Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Ala Trp Ala Val Gly Phe Val Ser Ser Met Gly Ser Gly Asn Pro  
                   20                   25                   30  
 Ala Pro Gly Gly Val Cys Trp Leu Gln Gln Gly Gln Glu Ala Thr Cys  
                   35                   40                   45  
 Ser Leu Val Leu Gln Thr Asp Val Thr Arg Ala Glu Cys Cys Ala Ser  
                   50                   55                   60  
 Gly Asn Ile Asp Thr Ala Trp Ser Asn Leu Thr His Pro Gly Asn Lys  
 65                   70                   75                   80  
 Ile Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gly Leu Val His Cys Leu Pro Cys Lys  
                   85                   90                   95  
 Asp Ser Cys Asp Gly Val Glu Cys Gly Pro Gly Lys Ala Cys Arg Met  
                   100                   105                   110  
 Leu Gly Gly Arg Pro Arg Cys Glu Cys Ala Pro Asp Cys Ser Gly Leu  
                   115                   120                   125  
 Pro Ala Arg Leu Gln Val Cys Gly Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Arg Asp  
                   130                   135                   140  
 Glu Cys Glu Leu Arg Ala Ala Arg Cys Arg Gly His Pro Asp Leu Ser  
 145                   150                   155                   160  
 Val Met Tyr Arg Gly Arg Cys Arg Lys Ser Cys Glu His Val Val Cys  
                   165                   170                   175  
 Pro Arg Pro Gln Ser Cys Val Val Asp Gln Thr Gly Ser Ala His Cys  
                   180                   185                   190  
 Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Pro Val Pro Ser Ser Pro Gly Gln

[0018]





Ser Ser Gly Ala  
20

<210> 36  
<211> 369  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
多肽  
<400> 36

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
1                  5                  10                  15  
Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr  
                  20                  25                  30  
Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn  
                  35                  40                  45  
Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His  
                  50                  55                  60  
Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys  
65                  70                  75                  80  
Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys  
                  85                  90                  95  
[0021] Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly  
                  100                  105                  110  
Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr  
                  115                  120                  125  
Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly  
                  130                  135                  140  
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
145                  150                  155                  160  
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                  165                  170                  175  
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                  180                  185                  190  
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                  195                  200                  205  
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                  210                  215                  220  
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
225                  230                  235                  240  
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys  
                  245                  250                  255  
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
                  260                  265                  270  
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
                  275                  280                  285

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 290 295 300  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 325 330 335  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 340 345 350  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 355 360 365  
 Lys

<210> 37  
 <211> 1114  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 多核苷酸

[0022]

<400> 37  
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60  
 tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120  
 attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgacc gtgttatggt gacaaaagata 180  
 aacggcggca ttgttttctt acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaca 240  
 aggttggttg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300  
 cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaa agttttctta 360  
 tttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420  
 cgggtggtgga actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480  
 agtcttcctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt 540  
 cacatgcgtg gtggtggagc tgagccacga agaccctgag gtcaagtca actggtacgt 600  
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660  
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720  
 caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agtcccacg gagaaaacca tctccaaagc 780  
 caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840  
 caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgccctg 900  
 ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960  
 ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020  
 ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080  
 gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatagaga attc 1114

<210> 38  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 肽

<400> 38  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu  
 1 5  
 <210> 39  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 多肽  
 <400> 39  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
 [0023] Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 100 105 110  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 115 120 125  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 130 135 140  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 165 170 175  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 180 185 190  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 195 200 205  
 Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 210 215 220  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 245 250 255  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 260 265 270  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu







gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080  
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107  
 <210> 43  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 肽  
 <400> 43  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu  
 1 5  
 <210> 44  
 <211> 343  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 多肽  
 <400> 44  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 [0027] Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
 20 25 30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
 85 90 95  
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
 100 105 110  
 Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 115 120 125  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 130 135 140  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 145 150 155 160  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 165 170 175  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 180 185 190  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 195 200 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 210 215 220  
 Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 245 250 255  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 260 265 270  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 275 280 285  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 290 295 300  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 325 330 335  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 340

<210> 45

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0028]

<223> 人工序列的描述: 合成  
 多肽

<400> 45

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
 20 25 30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
 85 90 95  
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
 100 105 110  
 Ala Pro Thr  
 115

<210> 46

<211> 368

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成

多肽

&lt;400&gt; 46

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr  
                   20                   25                   30  
 Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn  
           35                   40                   45  
 Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His  
           50                   55                   60  
 Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys  
 65                   70                   75                   80  
 Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys  
                   85                   90                   95  
 Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly  
                   100                   105                   110  
 Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro  
           115                   120                   125  
 Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr  
           130                   135                   140  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 145                   150                   155                   160  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
                   165                   170                   175  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
           180                   185                   190  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
           195                   200                   205  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
           210                   215                   220  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 225                   230                   235                   240  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
                   245                   250                   255  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
           260                   265                   270  
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
           275                   280                   285  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
           290                   295                   300  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 305                   310                   315                   320  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
                   325                   330                   335

[0029]

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 340 345 350  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355 360 365

<210> 47  
 <211> 1107  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 多核苷酸

<400> 47  
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60  
 tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc 120  
 aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac 180  
 aagcggtgct actgctacgc ctcttgccgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240  
 aagggtgct gggacgatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300  
 gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcaact 360  
 catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc caccctcgac agccccacc 420  
 ggtggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480  
 gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 540  
 acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 660  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720  
 aagtcaagg tctccaacaa agcctccca gtcctccatc agaaaacat ctccaaagcc 780  
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 840  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900  
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960  
 tccgacgget ccttcttct ctatagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag 1020  
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080  
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

[0030]

<210> 48  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 48  
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
 20 25 30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80



Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
 85 90 95  
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile  
 100 105 110  
 Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser  
 115 120 125  
 Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu Thr Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 165 170 175  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 180 185 190  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 195 200 205  
 [0032] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 210 215 220  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 245 250 255  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 260 265 270  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 275 280 285  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 290 295 300  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 325 330 335  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 340 345 350  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 355 360 365  
 Gly Lys  
 370  
 <210> 51  
 <211> 116

<212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 51  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
                   20                   25                   30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
                   50                   55                   60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65                   70                   75                   80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
                   85                   90                   95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
                   100                   105                   110  
 Lys Pro Pro Thr  
                   115

<210> 52  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Rattus sp.  
 <400> 52

[0033]

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
                   20                   25                   30  
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
                   35                   40                   45  
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro  
                   50                   55                   60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
                   85                   90                   95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
                   100                   105                   110  
 Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
                   115                   120                   125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
                   130                   135                   140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145                   150  
 <210> 53  
 <211> 150

<212> PRT  
 <213> Sus scrofa  
 <400> 53  
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1                   5                   10                   15  
 Val Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
                   20                   25                   30  
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
           35                   40                   45  
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
       50                   55                   60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
                   85                   90                   95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
                   100                   105                   110  
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
           115                   120                   125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
       130                   135                   140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145                   150

[0034]

<210> 54  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 54  
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
                   20                   25                   30  
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
           35                   40                   45  
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
       50                   55                   60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
                   85                   90                   95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
                   100                   105                   110  
 Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
           115                   120                   125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
       130                   135                   140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145 150  
 <210> 55  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 55  
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
 35 40 45  
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
 50 55 60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
 85 90 95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
 100 105 110  
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
 115 120 125  
 [0035] Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145 150  
 <210> 56  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
 <400> 56  
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
 35 40 45  
 Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
 50 55 60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
 85 90 95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
 115 120 125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Val Gly Gly Leu Ser  
 145 150  
 <210> 57  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Xenopus sp.  
 <400> 57  
 Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Ala Thr Phe  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu  
 35 40 45  
 Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser  
 50 55 60  
 Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu  
 85 90 95  
 [0036] Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn  
 100 105 110  
 Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro  
 115 120 125  
 Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro  
 130 135 140  
 Ile Val Gly Leu Ser Met  
 145 150  
 <210> 58  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 58  
 Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe  
 20 25 30  
 Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu  
 35 40 45  
 Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp  
 50 55 60  
 Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu  
 65 70 75 80

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp  
                           85                          90                          95  
 Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu  
                           100                          105                          110  
 Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn  
                           115                          120                          125  
 Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu  
                           130                          135                          140  
 Val Pro Leu Met Leu Ile  
 145                          150  
 <210> 59  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
       共有多肽  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Thr, Ala 或不存在  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (121)..(121)  
 <223> Pro, Ala, Val 或 Met  
 <400> 59  
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu  
 1                          5                          10                          15  
 Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr  
                           20                          25                          30  
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu  
                           35                          40                          45  
 Arg Leu Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser  
                           50                          55                          60  
 Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp  
 65                          70                          75                          80  
 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu  
                           85                          90                          95  
 Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn  
                           100                          105                          110  
 Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr  
                           115                          120                          125  
 Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr  
                           130                          135                          140  
 Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met  
 145                          150

[0037]



|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
|        | 85  | 90  | 95  |
|        | Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu |     |     |
|        | 100   | 105 | 110 |
|        | Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu |     |     |
|        | 115   | 120 | 125 |
|        | Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala |     |     |
|        | 130   | 135 | 140 |
|        | Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro |     |     |
|        | 145   | 150 | 155 |
|        | Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val |     |     |
|        | 165   | 170 | 175 |
|        | Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val |     |     |
|        | 180   | 185 | 190 |
|        | Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln |     |     |
|        | 195   | 200 | 205 |
|        | Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln |     |     |
|        | 210   | 215 | 220 |
|        | Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala |     |     |
|        | 225   | 230 | 235 |
|        | Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro |     |     |
|        | 245   | 250 | 255 |
|        | Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr |     |     |
|        | 260   | 265 | 270 |
| [0039] | Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser |     |     |
|        | 275   | 280 | 285 |
|        | Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr |     |     |
|        | 290   | 295 | 300 |
|        | Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr |     |     |
|        | 305   | 310 | 315 |
|        | Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe |     |     |
|        | 325   | 330 | 335 |
|        | Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys |     |     |
|        | 340   | 345 | 350 |
|        | Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                                 |     |     |
|        | 355   | 360 |     |
|        | <210> 62  |     |     |
|        | <211> 1083  |     |     |
|        | <212> DNA   |     |     |
|        | <213> 人工序列  |     |     |
|        | <220>   |     |     |
|        | <223> 人工序列的描述: 合成   |     |     |
|        | 多核苷酸  |     |     |
|        | <220>   |     |     |
|        | <221> CDS   |     |     |
|        | <222> (76)..(396)   |     |     |
|        | <400> 62  |     |     |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtccttcggt | 60   |
|        | tcgccccggcg ccgct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg  | 111  |
|        | Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp                    |      |
|        | 1 5 10   |      |
|        | gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag    | 159  |
|        | Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu    |      |
|        | 15 20 25   |      |
|        | cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc    | 207  |
|        | Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly    |      |
|        | 30 35 40   |      |
|        | acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg gac gat gac ttc aac tgc    | 255  |
|        | Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys    |      |
|        | 45 50 55 60  |      |
|        | tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac    | 303  |
|        | Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr    |      |
|        | 65 70 75   |      |
|        | ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg    | 351  |
|        | Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu    |      |
|        | 80 85 90   |      |
|        | cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca        | 396  |
|        | Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr        |      |
|        | 95 100 105   |      |
| [0040] | ggtggtgaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    | 456  |
|        | gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc   | 516  |
|        | acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg  | 576  |
|        | gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg  | 636  |
|        | taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  | 696  |
|        | aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc     | 756  |
|        | aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc  | 816  |
|        | agaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg   | 876  |
|        | gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac  | 936  |
|        | tccgacggt ccttcttct ctatagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag     | 996  |
|        | gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag  | 1056 |
|        | agcctctccc tgtccccggg taaatga                                      | 1083 |
|        | <210> 63   |      |
|        | <211> 1083   |      |
|        | <212> DNA  |      |
|        | <213> 人工序列   |      |
|        | <220>  |      |
|        | <223> 人工序列的描述: 合成  |      |
|        | 多核苷酸   |      |
|        | <400> 63   |      |
|        | tcatttacc ggggacaggg agaggtctt ctgcgtgtag tggttgtgca gagectcatg    | 60   |
|        | catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt   | 120  |
|        | gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct tgtagttgtt  | 180  |
|        | ctccggtctc ccattgtct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac   | 240  |

caggcaggtc aggctgacct ggttcttggc catctcctcc cgggatgggg gcagggtgta 300  
 cacctgtggc tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360  
 gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctctttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420  
 gacggtgagg acgctgacca cacggtacgt gctgtttgac tgctcctccc gcggctttgt 480  
 cttggcatta tgcacctcca cgcctgccac gtaccagtgg aacttgacct cagggtcttc 540  
 gtggctcagc tccaccacca cgcctgtgac ctccagggtc cgggagatca tgagggtgtc 600  
 cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttcag gtgctgggca 660  
 cgggtgggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacgtga cttccggggc 720  
 cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgtc gtgcagaag ttgccttcac agcagcagaa 780  
 gtacacctgg gggttctcct cagtggccac aactcctgc ctatcgtagc agttgaagtc 840  
 atcgtcccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggaggc 900  
 gtagcagtgc agccgcttgt cctgctcgc ttcgacgac tccaggccgc tctggttggc 960  
 gcgtccagc tcccagttgg cgtttagta gatgactcc cgtgtctcag cggcgcgggg 1020  
 cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080  
 cat 1083

<210> 64

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
 多肽

<400> 64

[0041]

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg  
 20 25 30  
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu  
 35 40 45  
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln  
 50 55 60  
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly  
 85 90 95  
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His  
 100 105 110  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 130 135 140  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 165 170 175  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

180 185 190  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 195 200 205  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 210 215 220  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 245 250 255  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 260 265 270  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 275 280 285  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 290 295 300  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
多肽

<400> 65

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg  
 20 25 30  
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu  
 35 40 45  
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln  
 50 55 60  
 Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly  
 85 90 95  
 Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
 100 105

<210> 66

<211> 1083

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0042]

<223> 人工序列的描述: 合成  
多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (76)..(396)

<400> 66

|  |      |
|--|------|
| atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt          | 60   |
| tcgccccggcg ccgcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg          | 111  |
| Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp                            |      |
| 1                      5                      10                           |      |
| gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa            | 159  |
| Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu            |      |
| 15                      20                      25                         |      |
| cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg            | 207  |
| Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly            |      |
| 30                      35                      40                         |      |
| acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg gac gac gat ttc aat tgt            | 255  |
| Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys            |      |
| 45                      50                      55                      60 |      |
| tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat            | 303  |
| Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr            |      |
| 65                      70                      75                         |      |
| ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc            | 351  |
| Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu            |      |
| 80                      85                      90                         |      |
| ccc gaa gcc gcc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc                | 396  |
| Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr                |      |
| 95                      100                      105                       |      |
| ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca          | 456  |
| gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc           | 516  |
| acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg           | 576  |
| gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg          | 636  |
| taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac          | 696  |
| aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc            | 756  |
| aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc          | 816  |
| aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg          | 876  |
| gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac          | 936  |
| tccgacggct ccttcttctct ctatagcaag ctaccctgga acaagagcag gtggcagcag         | 996  |
| gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag          | 1056 |
| agcctctccc tgtccccggg taaatga  | 1083 |

<210> 67

<211> 1083

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

多核苷酸

<400> 67  
 tcatttacc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaggcctcatg 60  
 catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtgagctt 120  
 gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct tgtagtgtt 180  
 ctccggctgc ccattgctct ccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240  
 caggcaggtc aggctgacct ggttcttggc catctctctc cgggatgggg gcagggtgta 300  
 cacctgtggt tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360  
 gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctctttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420  
 gacggtgagg acgctgacca cacggtacct gctgtttgac tgctctccc gcggctttgt 480  
 cttggcatta tgcacctcca cgcctccac gtaccagtta aacttgacct cagggtcttc 540  
 gtggctcacg tccaccacca cgcattgtac ctccagggtc cgggagatca tgagggtgac 600  
 cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cgggtcccc aggagttcag gtgctgggca 660  
 cgggtgggcat gtgtgagttc caccaccggt gggcgggggt tcataggtca cctcggggcc 720  
 gccgcttcg gggaggtggg taaaccgtc attacagaaa tcccctcgc aacaacagaa 780  
 atagacctgc ggattctctt cggctcgcac acattctctg cggtcataac aattgaaatc 840  
 gtcgtcccag caccctttct tgaccagttc aatcgtccc gaggagtcc tccacgacgc 900  
 atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctacacctg tcgagcccg attggtctgt 960  
 ccgttcgagt tccaattag cattgtaata aatactctg cgggtttcgg cggcgccggg 1020  
 cgaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080  
 cat 1083

[0044]

<210> 68  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成

多核苷酸

<400> 68  
 gaaaccgcg aatgtattta ttacaatgct aattgggaac tcgaacggac gaaccaatcc 60  
 gggctcgaac ggtgtgaggg ggaacaggat aaacgcctcc attgctatgc gtcgtggagg 120  
 aactcctccg ggacgattga actggtcaag aaagggtgct gggacgacga tttcaattgt 180  
 tatgaccgcc aggaatgtgt cgcgaccgaa gagaatccgc aggtctatct ctgtttgtgc 240  
 gaggggaatt tctgtaatga acggtttacc cacctcccc aagccggcgg gcccagagtg 300  
 acctatgaac cccgcccac c 321

<210> 69  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 69  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
 100 105 110  
 Lys Pro Pro  
 115  
 <210> 70  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> *Ovis aries*  
 <400> 70  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Phe Tyr Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Arg Asp Arg Thr Asn Arg Thr Gly Val Glu Ser Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Ile Asp Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 [0045] Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Arg Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
 100 105 110  
 Lys Pro Pro  
 115  
 <210> 71  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> *Condylura cristata*  
 <400> 71  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Arg Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80



Lys Pro Pro  
 115  
 <210> 74  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
 <400> 74  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Phe Tyr Asn Ala Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Trp Glu Arg Asp Arg Thr Asn Arg Thr Gly Val Glu Ser Cys Tyr Gly  
                   20                   25                   30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
                   50                   55                   60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65                   70                   75                   80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Arg Phe Ser Tyr  
                   85                   90                   95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
                   100                   105                   110

Lys Pro Pro  
 115  
 [0047] <210> 75  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Tyto alba  
 <400> 75  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Trp Glu Lys Asp Lys Thr Asn Arg Ser Gly Ile Glu Pro Cys Tyr Gly  
                   20                   25                   30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
                   50                   55                   60  
 Cys Tyr Asp Arg Asn Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Arg Phe Phe Tyr  
                   85                   90                   95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
                   100                   105                   110

Lys Pro Pro  
 115  
 <210> 76  
 <211> 115

<212> PRT  
 <213> Myotis davidii  
 <400> 76  
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Phe Tyr Asn Ala Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Trp Glu Arg Asp Lys Thr Asn Arg Thr Gly Val Glu Leu Cys Tyr Gly  
                   20                   25                   30  
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
                   50                   55                   60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65                   70                   75                   80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Arg Phe Ser Tyr  
                   85                   90                   95  
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
                   100                   105                   110  
 Lys Pro Pro  
                   115

[0048]

<210> 77  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> 未知的描述:  
       天然肽  
 <400> 77  
 Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Ser Gly Ala  
                   20  
 <210> 78  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
       多肽  
 <400> 78  
 Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg  
                   20                   25                   30  
 Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu  
                   35                   40                   45  
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln



20 25 30  
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp  
 50 55 60  
 Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu  
 85 90 95  
 Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu  
 100 105 110  
 Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu  
 115 120 125  
 Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 130 135 140  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 165 170 175  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 180 185 190  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 195 200 205  
 [0050] Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 210 215 220  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 245 250 255  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 260 265 270  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 275 280 285  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 290 295 300  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 325 330 335  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 340 345 350  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355 360  
 <210> 80  
 <211> 1083  
 <212> DNA

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
     多核苷酸  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (73)..(396)  
 <400> 80

|  |      |
|--|------|
| atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt  | 60   |
| tcgcccggcg cc gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg  | 111  |
| Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp                |      |
| 1 5 10   |      |
| gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag    | 159  |
| Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu    |      |
| 15 20 25   |      |
| cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc    | 207  |
| Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly    |      |
| 30 35 40 45  |      |
| acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc    | 255  |
| Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys    |      |
| 50 55 60   |      |
| tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac    | 303  |
| Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr    |      |
| 65 70 75   |      |
| ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg    | 351  |
| Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu    |      |
| 80 85 90   |      |
| cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca        | 396  |
| Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr        |      |
| 95 100 105   |      |
| ggtggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca   | 456  |
| gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc   | 516  |
| acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg | 576  |
| gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg  | 636  |
| taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  | 696  |
| aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc     | 756  |
| aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc  | 816  |
| aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggettct atcccagcga catcgccgtg  | 876  |
| gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac  | 936  |
| tccgacgget ccttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag   | 996  |
| gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag  | 1056 |
| agcctctccc tgtccccggg taaatga                                      | 1083 |

<210> 81  
 <211> 1083  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 多核苷酸  
 <400> 81  
 tcatttaccc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaggctcatg 60  
 catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgcca cggtagactt 120  
 gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct tgtagttgtt 180  
 ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240  
 caggcaggtc aggctgacct gtttcttggc catctctccc cgggatgggg gcagggtgta 300  
 cacctgtggt tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360  
 gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctcccttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420  
 gacggtgagg acgctgacca cacggtacct gctggtgtac tgctcctccc gcggctttgt 480  
 cttggcatta tgcacctcca cgcggtccac gtaccagtgt aacttgacct cagggtcttc 540  
 gtggctcag tccaccacca cgcagtgtac ctccagggtc cgggagatca tgagggtgct 600  
 cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cgggtccccc aggagttagc gtgctgggca 660  
 cggtagggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacctga cttccgggccc 720  
 cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgtc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa 780  
 gtacacctgg ggtttctct cagtggccac acactctgct ctatcgtagc agttgaagtc 840  
 atctagccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggaggc 900  
 gtagcagtgc agccgcttgt cctgctcggc ttgcagcgc tccaggccgc tctggttgg 960  
 gcgctccagc tcccagttgg cgtttagta gatgactcc cgtgtctcag cggcgcgggg 1020  
 cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080  
 cat 1083

[0052]

<210> 82  
 <211> 1083  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成  
 多核苷酸  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (73)..(396)  
 <400> 82  
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggage agtcttcggt 60  
 tcgcccggcg cc gcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg 111  
 Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp  
 1 5 10  
 gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa 159  
 Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu  
 15 20 25  
 cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tgc tgg agg aac tcc tcc ggg 207  
 Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly  
 30 35 40 45  
 acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg ctg gac gat ttc aat tgt 255  
 Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys

|        |   |     |     |      |
|--------|---|-----|-----|------|
|        | 50  | 55  | 60  |      |
|        | tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat   |     |     | 303  |
|        | Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr   |     |     |      |
|        | 65  | 70  | 75  |      |
|        | ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac etc   |     |     | 351  |
|        | Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu   |     |     |      |
|        | 80  | 85  | 90  |      |
|        | ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc       |     |     | 396  |
|        | Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr       |     |     |      |
|        | 95  | 100 | 105 |      |
|        | ggtggtgaa ctacacatg cccaccgtg ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    |     |     | 456  |
|        | gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc   |     |     | 516  |
|        | acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg   |     |     | 576  |
|        | gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg |     |     | 636  |
|        | taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac |     |     | 696  |
|        | aagtcaagg tctccaaca agccctccca gcccccacg agaaaacat ctccaaagcc     |     |     | 756  |
|        | aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc |     |     | 816  |
|        | aagaaccagg tcagcctgac ctgacctgtc aaaggttct atcccagcga catgcccgtg  |     |     | 876  |
|        | gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac |     |     | 936  |
|        | tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag   |     |     | 996  |
|        | gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag   |     |     | 1056 |
|        | agcctctccc tgtccccggg taaatga                                     |     |     | 1083 |
| [0053] | <210> 83  |     |     |      |
|        | <211> 1083  |     |     |      |
|        | <212> DNA   |     |     |      |
|        | <213> 人工序列  |     |     |      |
|        | <220>   |     |     |      |
|        | <223> 人工序列的描述: 合成   |     |     |      |
|        | 多核苷酸  |     |     |      |
|        | <400> 83  |     |     |      |
|        | tcatttacc ggggacagg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaccctcatg   |     |     | 60   |
|        | catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagactt |     |     | 120  |
|        | gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct ttagttgtt  |     |     | 180  |
|        | ctccggctgc ccattgtct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac  |     |     | 240  |
|        | caggcaggtc aggctgacct gttctttggt catctctcc cgggatgggg gcagggtgta  |     |     | 300  |
|        | cacctgtggt tctcggggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tggggctgg   |     |     | 360  |
|        | gagggtttg ttggagacct tgcacttcta ctccctgcca ttcagccagt cctggtgcag  |     |     | 420  |
|        | gacggtgagg acgctgacca cacggtactg gctgtgttac tgctcctccc gcggctttgt |     |     | 480  |
|        | cttggcatta tgcacctcca cgcctccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc  |     |     | 540  |
|        | gtggctcag tcaccacca cgcattgtac ctccagggtc cgggagatca tgagggtgtc   |     |     | 600  |
|        | cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagtccag gtgctgggca  |     |     | 660  |
|        | cggtagggcat gttgagttc caccaccgtt gggcgggggt tcataggtca cctcgggccc |     |     | 720  |
|        | gccgcttcg gggaggtggg taaaccgttc attacagaaa tccccctgc aacaacagaa   |     |     | 780  |
|        | atagacctgc ggattctctt cggctcgcac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc |     |     | 840  |
|        | gtccagccag cacccttctt tgaccagttc aatcgtccc gaggagttcc tccacagcc   |     |     | 900  |
|        | atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctacaccgt tcgagcccgg attggttcgt  |     |     | 960  |



|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | aagcggctgc actgctacgc ctcttgccgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag  | 240  |
|        | aaggctgct gggatgatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag   | 300  |
|        | gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcaact | 360  |
|        | catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc cacccccgac agccccacc   | 420  |
|        | ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca  | 480  |
|        | gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tetcccggac cctgaggtc    | 540  |
|        | acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg    | 600  |
| [0055] | gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg  | 660  |
|        | taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  | 720  |
|        | aagtcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc     | 780  |
|        | aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc  | 840  |
|        | aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga catcgccgtg   | 900  |
|        | gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac  | 960  |
|        | tccgacggct cttcttctct ctatagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag   | 1020 |
|        | gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag | 1080 |
|        | agcctctccc tgtccccggg taaatga                                      | 1107 |

ActRIIa ILGRSETQEC IFFENANWEKD RTNQTGV<sup>1</sup>EP<sup>2</sup>C YGDKDKRRHC FATWKNISGS  
 ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTN<sup>3</sup>Q<sup>4</sup>SL<sup>5</sup>ER<sup>6</sup>C EGEQDKRLHC YASWRN<sup>7</sup>SS<sup>8</sup>GT

IEIVKQGWL DDINCYDR<sup>9</sup>TD CVEKKDSPEV Y<sup>10</sup>CCCEGNMC NEKFSYFPEM  
 IELVKKGWL DDFNCYDR<sup>11</sup>QE CVATEENPQV Y<sup>12</sup>CCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT  
 GGPEVTYEPPTAPT

图 1

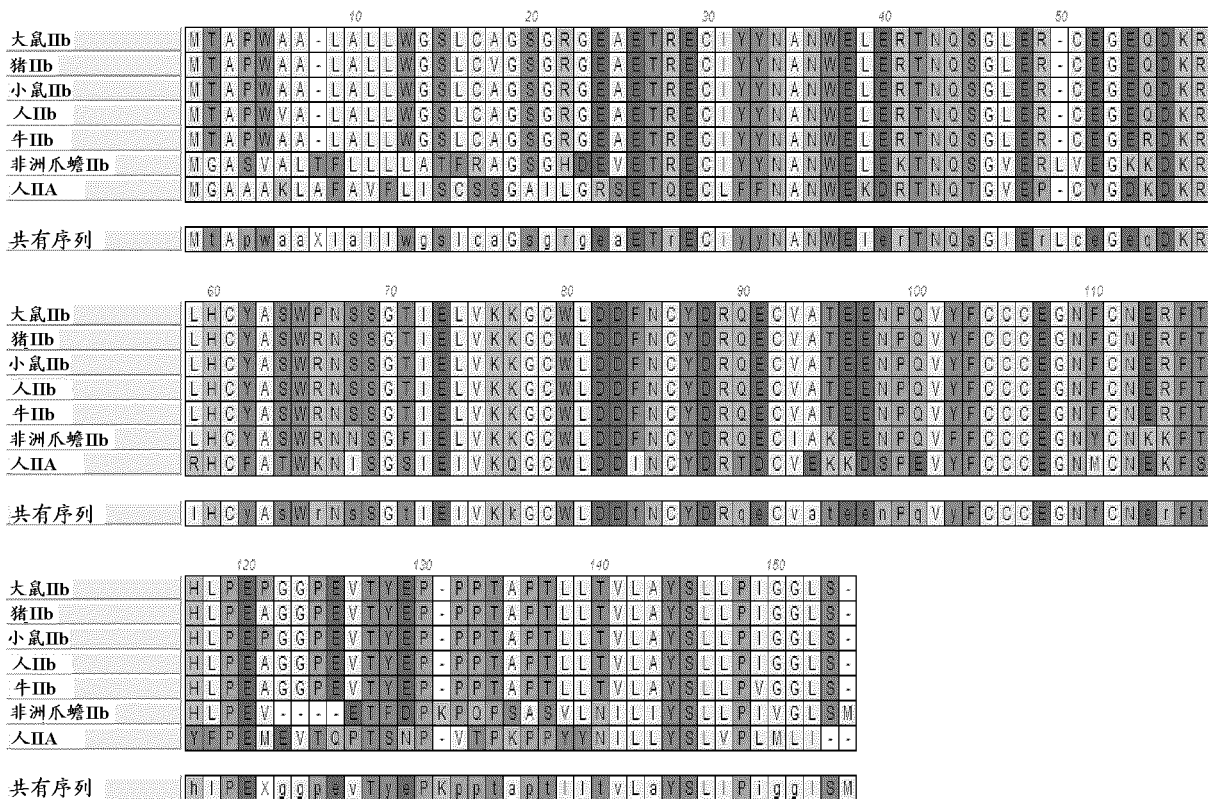


图 2

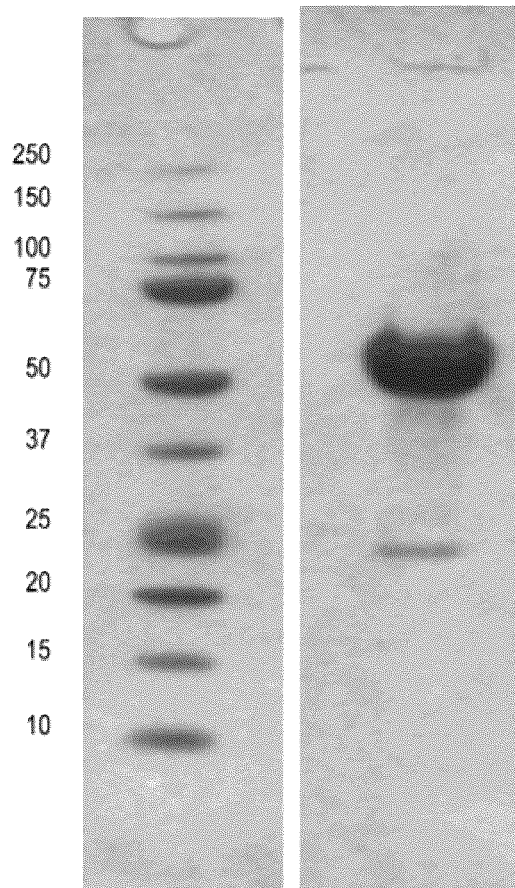
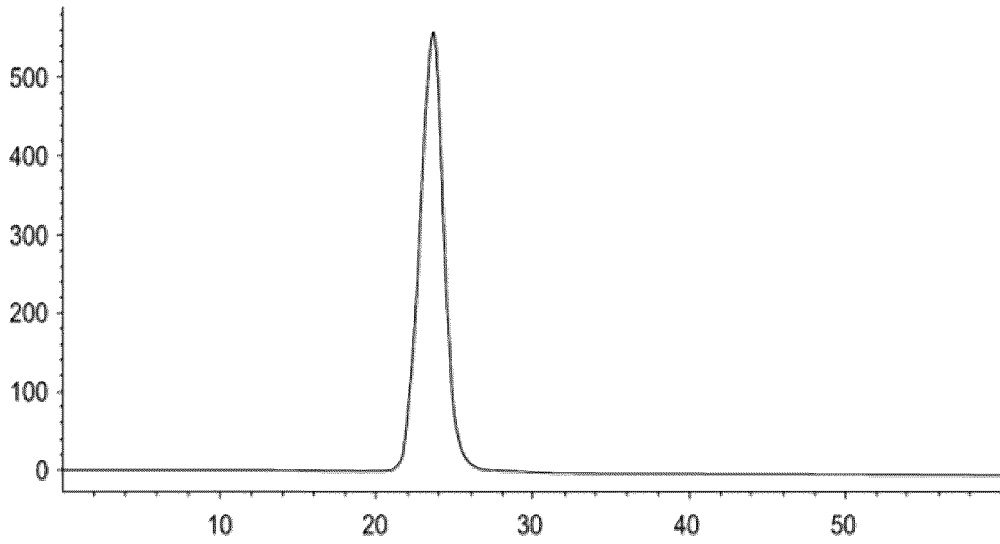


图 3

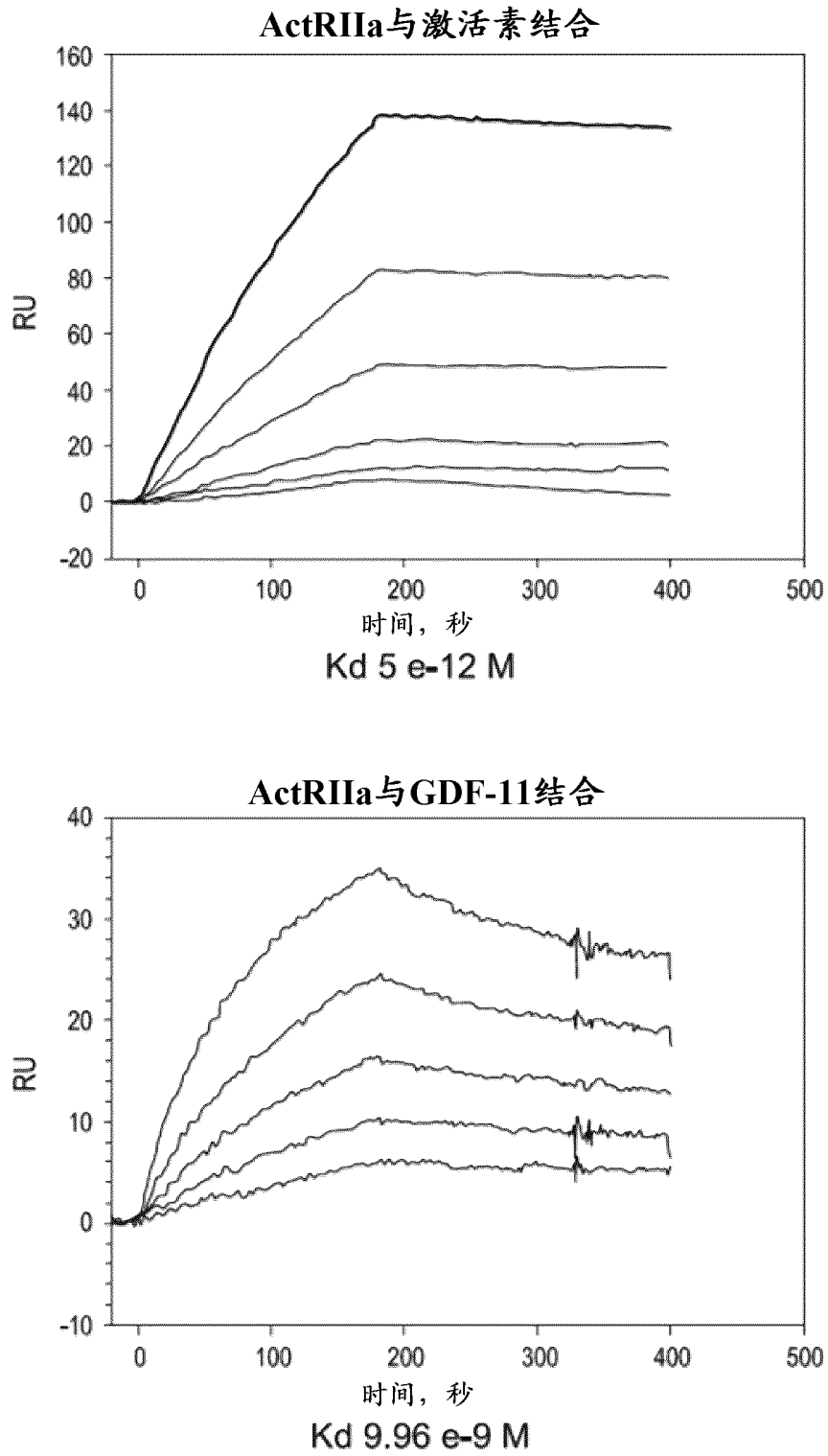


图 4

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS  
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE  
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC  
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV  
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH  
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:46)

图 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG  
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC  
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC  
 CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT  
 GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG  
 CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTA CTTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA  
 CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC  
 CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCC GGGCCTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCGAC AGCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC  
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA  
 GGTGCTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG  
 TGGGTTCTCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
 ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  
 CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCTCTGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTG CACCAGGACT  
 GTTGTGCTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTTGA

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
 CCGACTTACC GTTCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC  
 CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

图 6A

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCAGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG  
TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG  
AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
CTCACCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG  
CTCCGAGACG TGTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCC

1101 TAAATGA (SEQ ID NO:47)  
ATTTACT (SEQ ID NO:60)

图 6B

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQGLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPOV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPPTGGGTHTTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 61)

图 7

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
                                     E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCAGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCCG GCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT
                                     N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG
                                     E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCACAACAG
   CTCCGCTCG TCCTGTTTCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC
                                     S G T I E L V K K G C W D D D F
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
   GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCTG CTACTGAAGT
                                     N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGTCCAC
                                     Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA
                                     P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC
401 GTGGAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTG GTGGACTTGA GGACCCCCCT
451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

```

图 8A

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
 651 CGTCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC  
 TTTCCGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTC TGGTCCAGTC GGAAGTGGACG GACCAGTTTC  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
 901 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA GTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
 951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTAATCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 62)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 63)

图 8B

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
 51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
 101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
 151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
 201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ  
 251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV  
 301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 64)

图 9

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
 51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
 101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 65)

图 10

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

E T R E C I Y Y

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA  
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C

101 ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT  
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S

151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC  
 CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

S G T I E L V K K G C W D D D F

201 CTCCGGGACG ATGAACTGG TCAAGAAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA  
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V

251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC  
 TAACAATACT GGCGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

Y F C C C E G N F C N E R F T H L

301 TATTTCTGTT GTTGGGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT  
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

P E A G G P E V T Y E P P P T

351 CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACCGGTG  
 GGGGCTTCGG CCGCCC GGCC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA  
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
 GGCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

图 11A

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
CGTTCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC  
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGT CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGAAGTGGAC GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCCTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 66)  
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 67)

图 11B

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGA~~ACTCGAA~~ CGGACGAACC  
AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT  
GGAGGAAC~~TC~~ CTCCGGGACG ATTGA~~ACTGG~~ TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA  
ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT  
GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGGGGGCCCG  
AGGTGACCTA TGAACCC~~CCG~~ CCCACC (SEQ ID NO: 68)

图 12

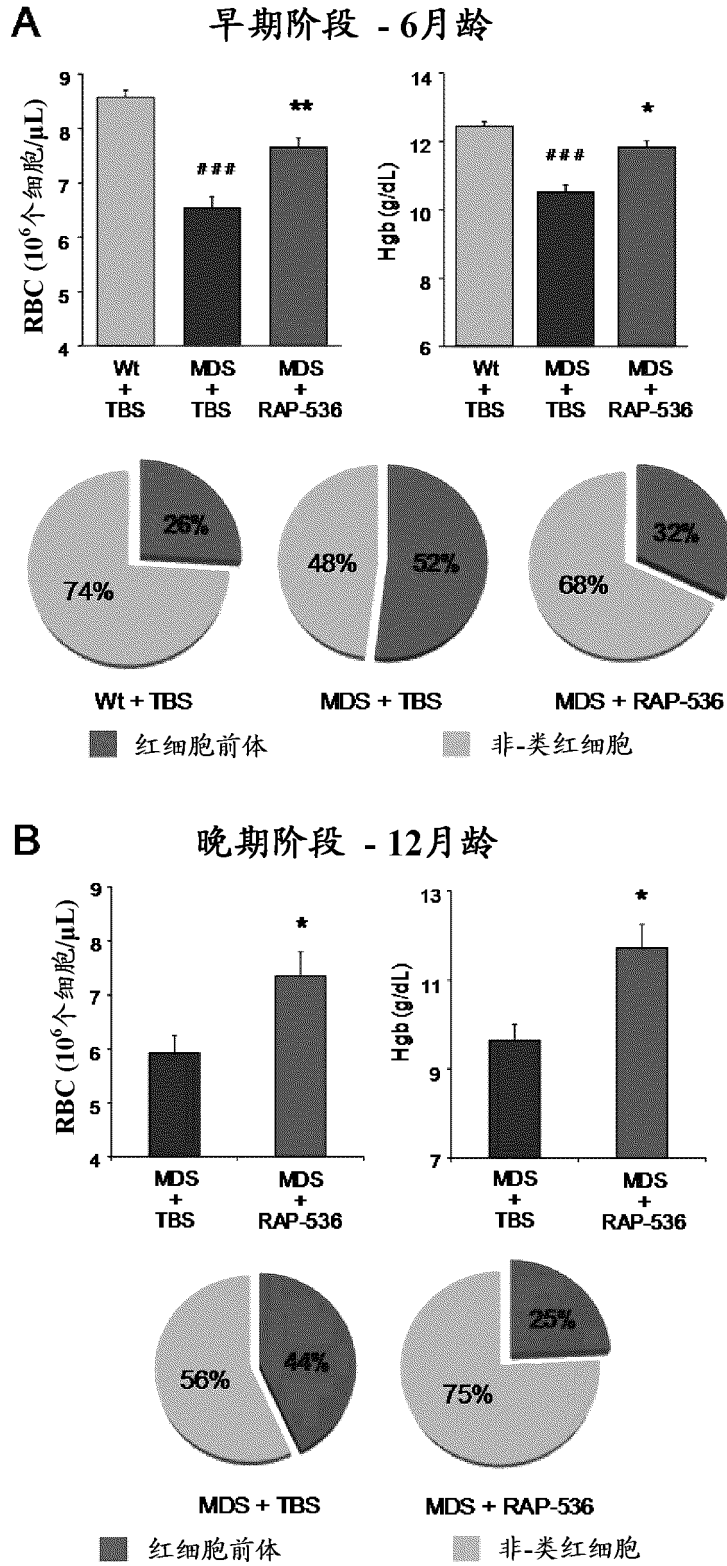


图 13

|     |                 |                |                |                |             |
|-----|-----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
|     | ..... 10 .....  | ..... 20 ..... | ..... 30 ..... | ..... 40 ..... | ..... 50    |
| 人   | ILGRSETQEC      | LFYNANWEKD     | RTNQTGVEPC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 绵羊  | ILGRSETQEC      | IFYNANWERD     | RTNRTGVESC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 鼯鼠  | ILGRSETQEC      | LFYNANWERD     | RTNQTGVEPC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 小鼠  | ILGRSETQEC      | LFYNANWERD     | RTNQTGVEPC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 鸡   | ILGRSETQEC      | IYYNANWEKD     | KTNRSGIEPC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 牛   | ILGRSETQEC      | IFYNANWERD     | RTNRTGVESC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 猫头鹰 | ILGRSETQEC      | IYYNANWEKD     | KTNRSGIEPC     | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
| 蝙蝠  | ILGRSETQEC      | IFYNANWERD     | KTNRRTGVELC    | YGDKD KRRHC    | FATWKNISGS  |
|     | ..... 60 .....  | ..... 70 ..... | ..... 80 ..... | ..... 90 ..... | ..... 100   |
| 人   | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRTD     | CEKKDSPEV      | YFCCCEGNMC     | NEKFSYFPPEM |
| 绵羊  | IDIVKQGCWL      | DDINCYDRTD     | CEKKDSPEV      | YFCCCEGNMC     | NERFSYFPPEM |
| 鼯鼠  | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRTD     | CEKKDSPEV      | YFCCCEGNMC     | NEKFSYFPPEM |
| 小鼠  | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRTD     | CEKKDSPEV      | YFCCCEGNMC     | NEKFSYFPPEM |
| 鸡   | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRND     | CEKKDSPEV      | FFCCCEGNMC     | NERFFYFPPEM |
| 牛   | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRTD     | CEKKDSPEV      | YFCCCEGNMC     | NERFSYFPPEM |
| 猫头鹰 | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRND     | CEKKDSPEV      | FFCCCEGNMC     | NERFFYFPPEM |
| 蝙蝠  | IEIVKQGCWL      | DDINCYDRTD     | CEKKDSPEV      | YFCCCEGNMC     | NERFSYFPPEM |
|     | ..... 110 ..... |                |                |                |             |
| 人   | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |
| 绵羊  | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |
| 鼯鼠  | EVTQPTSNPV      | TPKAP          |                |                |             |
| 小鼠  | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |
| 鸡   | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |
| 牛   | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |
| 猫头鹰 | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |
| 蝙蝠  | EVTQPTSNPV      | TPKPP          |                |                |             |

图 14

IgG1 -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53  
IgG4 ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF 57  
IgG2 -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51  
IgG3 EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60  
                  \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \*

IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113  
IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117  
IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111  
IgG3 KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120  
: \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \*

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 173  
IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 177  
IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 171  
IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP 180  
\* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \*

IgG1 PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225  
IgG4 PVLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229  
IgG2 PMLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223  
IgG3 PMLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK 232  
\* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* \* \*

图 15

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAITREC IYYNANWELE RTNQSGLERC  
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV  
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG  
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA  
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS  
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP  
301 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT  
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 79)

图 16

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
                                     A E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCC GGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT
                                     N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG
                                     E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG
   CTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCCTTGTG
                                     S G T I E L V K K G C W L D D F
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
   GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTA CTACTGAAGT
                                     N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC
                                     Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA
                                     P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CGTCTCCGA CCCC GGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC
401 GTGGAAC TCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT
451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG
601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC
651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA
701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
   TTTCCGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

```

图 17A

```
801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTGTA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTTCTCTAT  AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 80)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 81)
```

图 17B

1     ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
       TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG  
   A E T R E C I Y Y  
 51     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA  
       TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGCTTTG GCGCCTTACA TAAATAATGT  
                   N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 101    ATGCTAATG GGA~~ACTCGAA~~ CCGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT  
       TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA  
                   E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 151    GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC  
       CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG  
                   S G T I E L V K K G C W L D D F  
 201    CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACGATTTCA  
       GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT  
                   N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
 251    ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGAGGTC  
       TAACAATACT GCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG  
                   Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 301    TATTTCTGTT GTTGGGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT  
       ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTA~~CTTGCCA~~ AATGGGTGGA  
                   P E A G G P E V T Y E P P P T  
 351    CCCCGAAGCC GCGGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACCGGTG  
       GGGGCTTCGG CCGCCC~~GGC~~ TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGTGGCCAC  
 401    GTGGA~~ACTCA~~ CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA  
       CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGA~~CTTGA~~ GGACCC~~CCCT~~  
 451    CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
       GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG  
 501    CCGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
       GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG  
 551    CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
       GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG  
 601    AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
       TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
 651    CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
       GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
 701    GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
       CGTTCAGAG GTTGT~~TTTCG~~ GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGT~~AGAG~~  
 751    AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC  
       TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

图 18A

```
801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
901   GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
      CTCTTGTTGA TGTTCCTGGT CCGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
951   CTTCTCTAT  AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT  
1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 82)  
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 83)
```

图 18B