(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110603049 A
(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201880023486.7

(22)申请日 2018.02.05

(30)优先权数据
62/455,266 2017.02.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/016794 2018.02.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/144968 EN 2018.08.09

(71)申请人 阿塞勒隆制药公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 G·李 A·格林伯格 D·萨科

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
A61K 38/43(2006.01)
A61K 38/19(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C07K 14/52(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)

权利要求书13页 说明书129页 附图30页

(54)发明名称

用于治疗心力衰竭的组合物和方法

(57)摘要

在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症和降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度或进展的方法。例如,本公开文本提供了多种BMP拮抗剂如ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽、内皮糖蛋白多肽、BMP10前肽蛋白及其Fc融合蛋白以及抗BMP9抗体,用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症和降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度或进展。

CN 110603049 A

1.一种降低患有心力衰竭的患者的死亡和/或住院治疗风险的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

2.根据权利要求1的方法,其中所述患者的死亡是由于任何原因。

3.根据权利要求1的方法,其中所述患者的死亡是由于心血管事件。

4.根据权利要求3的方法,其中所述心血管事件选自:心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留和心力衰竭进展。

5.根据权利要求1的方法,其中所述患者的住院治疗是由于任何原因。

6.根据权利要求1的方法,其中所述患者的住院治疗是由于心血管事件。

7.根据权利要求6的方法,其中所述心血管事件选自:心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留、心力衰竭进展。

8.一种降低患者的心力衰竭进展的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

9.一种降低患者的心血管事件的发生率的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

10.根据权利要求1的方法,其中所述心血管事件选自:心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留、心力衰竭进展。

11.根据权利要求9或10的方法,其中所述心血管事件会导致患者住院治疗。

12.一种治疗、预防患者的心肌纤维化或者降低患者的心肌纤维化的严重程度的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

13.一种治疗、预防患者的心脏肥大或者降低患者的心脏肥大的严重程度的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

14.根据权利要求13的方法,其中所述心肌肥大是向心性和/或离心性肥大。

15.一种治疗、预防患者的心脏重塑或者降低患者的心脏重塑的严重程度的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

16.根据权利要求15的方法,其中所述心脏重塑是心室重塑。

17.根据权利要求15的方法,其中所述心脏重塑是心室扩张。

18.根据权利要求15的方法,其中所述方法减少了舒张末期室间隔。

19.根据权利要求15的方法,其中所述方法减少了舒张末期后壁。

20.一种治疗、预防患者的心功能障碍或者降低患者的心功能障碍的严重程度的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

21.根据权利要求20的方法,其中所述方法增加了心脏射血分数。

22.根据权利要求21的方法,其中所述方法使心脏射血分数增加至少5%(例如,至少5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、65%或更多)。

23.根据权利要求20-22中任一项的方法,其中所述方法减少了等容舒张时间。

24.根据权利要求23的方法,其中所述方法使等容舒张时间减少至少2ms(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多ms)。

25.根据权利要求20-24中任一项的方法,其中所述方法增加了短轴缩短率。

26.根据权利要求25的方法,其中所述方法使短轴缩短率增加至少5%(例如,至少5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%或更多)。

27.一种治疗、预防患者的高血压或者降低患者的高血压的严重程度的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

28.根据权利要求27的方法，其中所述方法降低了所述患者的血压。

29.根据权利要求28的方法，其中所述方法降低了收缩压。

30.根据权利要求29的方法，其中所述方法使收缩压降低至少4mm Hg(例如，至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多mm Hg)。

31.根据权利要求27的方法，其中所述方法降低了舒张压。

32.根据权利要求31的方法，其中所述方法使舒张压降低至少2mm Hg(例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多mm Hg)。

33.根据权利要求28-32中任一项的方法，其中将血压测量为静息血压。

34.根据权利要求28-32中任一项的方法，其中将血压测量为动态血压。

35.一种治疗、预防心脏病或心脏病的一种或多种并发症或者或降低心脏病或心脏病的一种或多种并发症的严重程度的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

36.根据权利要求35的方法，其中所述心脏病的一种或多种并发症选自：呼吸困难(呼吸短促)、端坐呼吸、阵发性夜间呼吸困难和疲劳(这可能限制运动耐量)、液体潴留(这可能导致例如肺充血和外周性水肿)、心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌病、心脏肥大、心源性哮喘、夜尿症、腹水、充血性肝病、凝血病、肾血流量减少、肾功能不全、心肌梗塞和中风。

37.根据任一前述权利要求的方法，其中在心肌梗塞之后将所述BMP拮抗剂给予所述患者。

38.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者患有左心室收缩功能不全。

39.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者的射血分数为≤40％。

40.根据权利要求1-38中任一项的方法，其中所述患者的射血分数为≤35％。

41.根据权利要求39或40的方法，其中通过放射性核素心室显像术、放射性核素血管造影术、超声心动描记术或心室对比血管造影术中的一种或多种测量所述射血分数。

42.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、主动脉狭窄心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。

43.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者患有选自以下项的一种或多种并发症：呼吸困难、端坐呼吸、主动脉狭窄、阵发性夜间呼吸困难、疲劳、液体潴留、肺充血、水肿、外周性水肿、心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌病、心脏肥大、肾血流量减少、肾功能不全、心肌梗塞、心脏重塑、心肌纤维化、心脏高血压、心脏壁应力、心脏炎症、心脏压力过载、心脏容量过载、中风、心腔扩张、心室球形度增加、间质纤维化、血管周纤维化、心肌细胞肥大、心源性哮喘、夜尿症、腹水、充血性肝病、凝血病、急性缺血性损伤、再灌注损伤、左心室功能受损和右心室功能受损。

44.根据任一前述权利要求的方法，其中所述方法治疗、预防选自以下项的一种或多种并发症或降低选自以下项的一种或多种并发症的严重程度：呼吸困难、端坐呼吸、阵发性夜间呼吸困难、疲劳、液体潴留、肺充血、水肿、外周性水肿、心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌病、心脏肥大、肾血流量减少、主动脉狭窄、肾功能不全、心肌梗塞、心脏重塑、心肌纤维化、心脏高血压、心脏壁应力、心脏炎症、心脏压力过载、心脏容量过载、中风、心腔扩张、心室球形度增加、间质纤维化、血管周纤维化、心肌细胞肥大、心源性哮喘、夜尿症、腹水、充血性肝病、凝血病、急性缺血性损伤、再灌注损伤、左心室功能受损和右心室功能受损。

45.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者患有选自以下项的一种或多种病症：系统性高血压、肺动脉高压、糖尿病、肾脏(肾)衰竭(例如急性或慢性肾衰竭)、冠状动脉疾病、高血压、左心室功能不全、心脏瓣膜病、先天性心脏缺陷、急性缺血性损伤、再灌注损伤、心脏重塑心包障碍、心肌障碍、大血管障碍和心内膜障碍。

46.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭。

47.根据权利要求46的方法，其中所述患者患有按照NYHA功能分类的II类、III类或IV类心力衰竭。

48.根据权利要求46的方法，其中所述患者患有按照NYHA功能分类的II类或III类心力衰竭。

49.根据权利要求46的方法，其中所述患者患有按照NYHA功能分类的III类或IV类心力衰竭。

50.根据权利要求46的方法，其中所述患者患有按照NYHA功能分类的IV类心力衰竭。

51.根据任一前述权利要求的方法，其中所述方法使按照NYHA功能分类系统的患者心力衰竭得分改善了至少一个类别(例如，从IV类到III类心力衰竭、从IV类到II类心力衰竭、从IV类到I类心力衰竭、从III阶段到II阶段心力衰竭、从III阶段到I阶段心力衰竭或从II类到I类心力衰竭的改善)。

52.根据任一前述权利要求的方法，其中所述方法使按照NYHA功能分类系统的患者心力衰竭得分的进展阻止或延迟了至少一个类别(例如，延迟从I类到II类心力衰竭的进展、延迟从I类到III类心力衰竭的进展、延迟从I类到IV类心力衰竭的进展、延迟从II类到III类心力衰竭的进展、延迟从II类到IV类心力衰竭的进展或延迟从III类到IV类心力衰竭的进展)。

53.根据任一前述权利要求的方法，其中所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭。

54.根据权利要求53的方法，其中所述患者患有按照ACC功能分类的B阶段、C阶段或D阶段心力衰竭。

55.根据任一前述权利要求的方法，其中所述方法使按照ACC功能分类系统的患者心力衰竭得分改善了至少一个阶段(例如，从D阶段到C阶段心力衰竭、从D阶段到B阶段心力衰竭、从D阶段到A阶段心力衰竭、从C阶段到B阶段心力衰竭、从C阶段到A阶段心力衰竭或从B阶段到A阶段心力衰竭的改善)。

56.根据任一前述权利要求的方法，其中所述方法使按照ACC功能分类系统的患者心力

衰竭得分的进展阻止或延迟至少一个阶段(例如,阻止或延迟从A阶段到B阶段心力衰竭的进展、延迟从A阶段到C阶段心力衰竭的进展、延迟从A阶段到D阶段心力衰竭的进展、延迟从B阶段到C阶段心力衰竭的进展、延迟从B阶段到D阶段心力衰竭的进展或延迟从C阶段到D阶段心力衰竭的进展)。

57.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法治疗、预防心肌纤维化或降低心肌纤维化的严重程度。

58.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法治疗、预防心脏肥大或降低心脏肥大的严重程度。

59.根据权利要求58的方法,其中所述心肌肥大是向心性和/或离心性肥大。

60.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法治疗、预防患者的心脏重塑或者降低患者的心脏重塑的严重程度,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

61.根据权利要求60的方法,其中所述心脏重塑是心室重塑和/或心室扩张。

62.根据权利要求60的方法,其中所述方法减少舒张末期室间隔和/或舒张末期后壁。

63.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法治疗、预防患者的心功能障碍或降低患者的心功能障碍的严重程度。

64.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法增加了心脏射血分数。

65.根据权利要求64的方法,其中所述方法使心脏射血分数增加至少5%(例如,至少5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、65%或更多)。

66.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法减少了等容舒张时间。

67.根据权利要求66的方法,其中所述方法使等容舒张时间减少至少2ms(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多ms)。

68.根据任一前述权利要求的方法,其中所述方法增加了短轴缩短率。

69.根据权利要求68的方法,其中所述方法使短轴缩短率增加至少5%(例如,至少5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%或更多)。

70.任何前述权利要求的方法,所述方法治疗、预防患者的高血压或降低患者的高血压的严重程度。

71.根据权利要求70的方法,其中所述方法降低了所述患者的血压。

72.根据权利要求71的方法,其中所述方法降低了收缩压。

73.根据权利要求72的方法,其中所述方法使收缩压降低至少4mm Hg(例如,至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多mm Hg)。

74.根据权利要求70的方法,其中所述方法降低了舒张压。

75.根据权利要求74的方法,其中所述方法使舒张压降低至少2mm Hg(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多mm Hg)。

76.根据任一前述权利要求的方法,其中所述BMP拮抗剂是ActRIIA多肽。

77.根据权利要求76的方法,其中所述ActRIIA多肽选自:

a.包含与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%相同的氨基酸序列的多肽;

b.包含与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%相同的氨基酸序列的多肽;和

c.包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽。

78.根据权利要求1-75中任一项的方法，其中所述BMP拮抗剂是ActRIIB多肽。

79.根据权利要求78的方法，其中所述ActRIIB多肽选自：

a.包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

c.包含与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％相同的氨基酸序列的多肽；

d.包含与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％相同的氨基酸序列的多肽；

e.包含与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％相同的氨基酸序列的多肽；

f.包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

g.包含与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％相同的氨基酸序列的多肽；和

h.包含与SEQ ID NO:133的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽。

80.根据权利要求79的方法，其中所述多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处不包含酸性氨基酸。

81.根据权利要求80的方法，其中所述多肽在关于SEQ ID NO:1的位置79处不包含D或E。

82.根据权利要求1-75中任一项的方法，其中所述BMP拮抗剂是BMPRII多肽。

83.根据权利要求82的方法，其中所述BMPRII多肽选自：

a.包含与SEQ ID NO:14的氨基酸27-150至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:14的氨基酸34-123至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；和

c.包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽。

84.根据权利要求1-75中任一项的方法，其中所述BMP拮抗剂是ALK1多肽。

85.根据权利要求84的方法，其中所述ALK1多肽选自：

a.包含与SEQ ID NO:20的氨基酸22-118至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:20的氨基酸34-95至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；和

c.包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

86.根据权利要求1-75中任一项的方法，其中所述BMP拮抗剂是内皮糖蛋白多肽。

87.根据权利要求86的方法，其中所述内皮糖蛋白多肽选自：

a.包含与SEQ ID NO:24的氨基酸26-378至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:24的氨基酸42-333至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

c.包含与SEQ ID NO:24的氨基酸26-346至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

d.包含与SEQ ID NO:24的氨基酸27-3581至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；和

e.包含与SEQ ID NO:24的氨基酸26-359至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

88.根据权利要求87的方法，其中所述内皮糖蛋白多肽不包含由SEQ ID NO:24的氨基酸379-430组成的序列。

89.根据权利要求87的方法，其中所述内皮糖蛋白多肽不包含来自由SEQ IDNO:24的氨基酸379-586组成的序列的超过50个连续氨基酸。

90.根据权利要求1-75中任一项的方法，其中所述BMP拮抗剂是BMP10前肽多肽。

91.根据权利要求90的方法，其中所述BMP10前肽多肽选自：

a.包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-296的任何一个的位置处结束的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列；

c.包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

d.包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列；

e.包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

f.包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列；

g.包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70%、75%、80%、

85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。

h.包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。

i.包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296；并且

j.包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。

92.根据权利要求76-91中任一项的方法，其中所述ActRIIA、ActRIIB、ALK1、内皮糖蛋白或BMP10pro多肽是包含免疫球蛋白Fc结构域的融合蛋白。

93.根据权利要求92的方法，其中所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG1 Fc免疫球蛋白结构域。

94.根据权利要求92或93的方法，其中所述融合蛋白包含位于ActRIIA、ActRIIB、ALK1、内皮糖蛋白或BMP10pro多肽结构域与Fc免疫球蛋白结构域之间的接头结构域。

95.根据权利要求94的方法，其中所述接头选自：GGG(SEQ ID NO:41)、GGGG(SEQ ID NO:42)、TGGGG(SEQ ID NO:43)、SGGGG(SEQ ID NO:44)、TGGG(SEQ ID NO:45)、SGGG(SEQ ID NO:46)或GGGGS(SEQ ID NO:47)。

96.根据前述权利要求的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合蛋白选自：

a.包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；和

c.c)包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽。

97.根据任一前述权利要求的方法，其中所述融合蛋白是选自以下的ActRIIB-Fc融合蛋白：

a.包含与SEQ ID NO:58的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:60的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

c.包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

d.包含与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％相同的氨基酸序列的多肽；

e.包含与SEQ ID NO:66的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

f.包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

g.包含与SEQ ID NO:131的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

h.包含与SEQ ID NO:132的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

98.根据权利要求97的方法,其中所述ActRIIB-Fc融合蛋白不包含在关于SEQ ID NO:1的位置79处含有酸性氨基酸的ActRIIB多肽结构域。

99.根据权利要求98的方法,其中所述ActRIIB多肽结构域在关于SEQ ID NO:1的位置79处不包含D或E。

100.根据任一前述权利要求的方法,其中所述BMPRII-Fc融合蛋白选自：

a.包含与SEQ ID NO:69的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

b.包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

101.根据任一前述权利要求的方法,其中所述ALK1-Fc融合蛋白选自：

a.包含与SEQ ID NO:74的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

b.包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

102.根据任一前述权利要求的方法,其中所述内皮糖蛋白-Fc融合蛋白选自：

a.包含与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%相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

c.包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

d.包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

e.包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽;和

f.包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽。

103.根据任一前述权利要求的方法,其中所述BMP10前肽-Fc融合蛋白选自：

a.包含与SEQ ID NO:82的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:84的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的多肽；

c.包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽;和

d.包含与SEQ ID NO:87的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽。

104.根据权利要求76-103中任一项的方法,其中所述多肽或融合蛋白包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰: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、生物素化氨基酸和缀合至脂质部分的氨基酸。

105.根据权利要求104的方法,其中所述多肽或融合蛋白具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。

106.根据权利要求76-104中任一项的方法,其中所述多肽或融合蛋白与BMP10和/或BMP9结合。

107.根据权利要求106的方法,其中所述多肽或融合蛋白还与选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体结合。

108.根据权利要求76-107中任一项的方法,其中所述多肽或融合蛋白抑制BMP10和/或BMP9。

109.根据权利要求108的方法,其中在基于细胞的测定中所述多肽或融合蛋白抑制BMP10和/或BMP9活性。

110.根据权利要求108或109的方法,其中所述多肽或融合蛋白还抑制选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体。

111.根据权利要求110的方法,其中在基于细胞的测定中所述多肽或融合蛋白抑制BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种的活性。

112.根据权利要求92-110中任一项的方法,其中所述融合蛋白是同二聚体。

113.根据权利要求1-75中任一项的方法,其中所述BMP拮抗剂是抗体或抗体的组合。

114.根据权利要求113的方法,其中所述抗体或抗体的组合与BMP10和/或BMP9结合。

115.根据权利要求114的方法,其中所述抗体或抗体的组合还与选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体结合。

116.根据权利要求113的方法,其中所述抗体或抗体的组合抑制BMP10和/或BMP9活性。

117.根据权利要求115的方法,其中所述抗体或抗体的组合还抑制选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体的活性。

118.根据权利要求113的方法,其中所述抗体或抗体的组合与选自BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白的一种或多种多肽结合。

119.根据权利要求113-118中任一项的方法,其中所述抗体或抗体的组合至少与成熟BMP10结合,并且与BMP10前肽竞争结合。

120.根据权利要求113-119中任一项的方法,其中所述抗体或抗体的组合与BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种结合,并且与BMP10前肽竞争结合。

121.根据权利要求1-75中任一项的方法,其中所述BMP拮抗剂是小分子。

122.根据权利要求121的方法,其中所述小分子抑制BMP9和/或BMP10的活性。

123.根据权利要求122的方法,其中所述小分子还抑制选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体的活性。

124.根据权利要求121的方法，其中所述小分子抑制选自BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和一种或多种Smad(例如，Smad 2和/或3)的一种或多种药剂的活性。

125.根据权利要求1-75中任一项的方法，其中所述BMP拮抗剂是核苷酸。

126.根据权利要求125的方法，其中所述核苷酸抑制BMP9和/或BMP10的活性。

127.根据权利要求126的方法，其中所述核苷酸还抑制选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体的活性。

128.根据权利要求125的方法，其中所述核苷酸抑制选自BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和一种或多种Smad(例如，Smad 2和/或3)的一种或多种药剂的活性。

129.根据前述权利要求的方法，其中向所述患者给予用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度的另外的活性剂或其他支持疗法。

130.根据权利要求129的方法，其中用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度的另外的活性剂或其他支持疗法选自：起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法、心脏移植、肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、多种类型的利尿剂、卡托普利、依那普利、赖诺普利、苯那普利、雷米普利、佐芬普利、喹那普利、培哚普利、赖诺普利、苯那普利、咪达普利、群多普利、西拉普利、和福辛普利、氯沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、厄贝沙坦、替米沙坦、依普罗沙坦、奥美沙坦、阿齐沙坦、非马沙坦、普萘洛尔、布新洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、拉贝洛尔、纳多洛尔、氧烯洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、索他洛尔、噻吗洛尔、醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、塞利洛尔、艾司洛尔、美托洛尔、奈比洛尔、butazamine、ICI-118,551、SR 59230A、苯氧苄胺、酚妥拉明、妥拉唑啉、曲唑酮、阿夫唑嗪、甲磺酸多沙唑嗪(Cardura和Carduran)、哌唑嗪、坦索罗辛、特拉唑嗪、西洛多辛、阿替美唑(如Antisedan)、咪唑克生、米氮平、育亨宾、酸化盐(如$CaCl_2$和NH_4CL)、精氨酸加压素受体2拮抗剂、选择性加压素V2拮抗剂、Na-H交换拮抗剂、碳酸酐酶抑制剂、髓袢利尿剂、渗透性利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪、黄嘌呤、二氢吡啶、氨氯地平、阿雷地平、阿折地平、巴尼地平、贝尼地平、西尼地平、氯维地平、伊拉地平、依福地平、非洛地平、拉西地平、乐卡地平、马尼地平、尼卡地平、硝苯地平、尼伐地平、尼莫地平、尼索地平、尼群地平、普拉地平、苯基烷胺钙通道阻断剂、维拉帕米、戈洛帕米、芬地林、苯并硫氮杂卓钙通道阻断剂、地尔硫卓、咪拉地尔、苄普地尔、氟桂利嗪、氟司必林、芬地林、gabapentinoid、齐考诺肽、地高辛、胺碘酮、小檗碱、左西孟旦、奥美坎替、儿茶酚胺、类花生酸、磷酸二酯酶抑制剂、依诺昔酮、米力农、氨力农、茶碱、胰高血糖素、胰岛素、硝普钠、肼苯哒嗪、二硝酸异山梨酯和单硝酸异山梨酯、硝酸甘油、苯二氮卓类、肾素抑制剂、可乐定、胍那苄、胍法辛、甲基多巴、和莫索尼定、米诺地尔、胍乙啶、美卡拉明、利血平、不可逆的环氧合酶抑制剂、腺苷二磷酸受体抑制剂、氯吡格雷、普拉格雷、替格瑞洛、和噻氯匹定、磷酸二酯酶抑制剂、西洛他唑、蛋白酶激活受体-1拮抗剂、沃拉帕沙、糖蛋白IIB/IIIA抑制剂、阿昔单抗、依替巴肽、替罗非班、腺苷再摄取抑制剂、双嘧达莫、凝血

噁烷抑制剂、凝血噁烷合酶抑制剂、和凝血噁烷受体拮抗剂、组织纤溶酶原激活剂、阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶、阿尼普酶、链激酶、尿激酶、达比加群、利伐沙班、阿哌沙班、香豆素、肝素及其衍生物、因子Xa抑制剂、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、贝曲西班、来他沙班、伊利巴西班、水蛭素、来匹卢定、比伐卢定、阿加曲班、达比加群、希美加群、抗凝血酶蛋白、巴曲酶、裂纤酶和维生素E。

131.一种包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的BMP10前肽(BMP10pro)多肽，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列。

132.根据权利要求131的BMP10pro多肽，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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。

133.根据权利要求131的BMP10pro多肽，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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。

134.一种包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的BMP前肽(BMP10pro)多肽，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。

135.根据权利要求134的BMP10pro多肽，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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。

136.根据权利要求134的BMP10pro多肽，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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。

137.根据权利要求131-136中任一项的BMP10pro多肽，其中所述BMP10pro多肽是包含免疫球蛋白Fc结构域的融合蛋白。

138.根据权利要求137的BMP10pro多肽，其中所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG1 Fc免疫球蛋白结构域。

139.一种包含BMP10pro结构域和Fc免疫球蛋白结构域的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述BMP10pro结构域由与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少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。

140.根据权利要求139的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述BMP10pro结构域由与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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。

141.根据权利要求139的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述BMP10pro结构域由与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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。

142.根据权利要求139-141中任一项的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述BMP10pro结构域不包含氨基酸RIRR的序列。

143.根据权利要求139-141中任一项的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。

144.根据权利要求137-143中任一项的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述融合蛋白包含位于所述BMP10pro多肽结构域与所述Fc免疫球蛋白结构域之间的接头结构域。

145.根据权利要求144的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述接头选自：GGG(SEQ ID NO:41)、GGGG(SEQ ID NO:42)、TGGGG(SEQ ID NO:43)、SGGGG(SEQ ID NO:44)、TGGG(SEQ ID NO:45)、SGGG(SEQ ID NO:46)或GGGGS(SEQ ID NO:47)。

146.根据权利要求131的BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述融合蛋白选自：

a.包含与SEQ ID NO:82的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

b.包含与SEQ ID NO:84的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；

c.包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽；和

d.包含与SEQ ID NO:87的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列的多肽。

147.根据权利要求131-146中任一项的BMP10pro多肽，其中所述多肽或融合蛋白包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰：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、生物素化氨基酸和缀合至脂质部分的氨基酸。

148.根据权利要求147的方法，其中所述多肽或融合蛋白具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。

149.根据权利要求131-148中任一项的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述多肽或融合蛋白与BMP10和/或BMP9结合。

150.根据权利要求149的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述多肽或融合蛋白还与选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体结合。

151.根据权利要求131-150中任一项的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述多肽抑制BMP10和/或BMP9的活性。

152.根据权利要求151的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白，其中所述多肽或融合蛋白还抑制选自BMP6、BMP3b和BMP5的一种或多种配体的活性。

153.根据权利要求151或152的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白，其中在基于细胞的测定中所述多肽抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种的活性。

154.一种药物制剂，其包含根据权利要求131-153中任一项的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白和药学上可接受的载体。

155.根据权利要求154的药物制剂，其中所述制剂基本上无热原。

156.一种分离和/或重组的多核苷酸，其包含根据权利要求131-153中任一项的BMP10pro多肽或BMP10pro-Fc融合蛋白的编码序列。

157.根据权利要求156的分离和/或重组的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含选自以下项的核酸序列:

158.一种重组多核苷酸,其包含与根据权利要求156或157的多核苷酸可操作地连接的启动子序列。

159.一种载体,其包含根据权利要求156-158中任一项的分离和/或重组的多核苷酸。

160.一种细胞,其包含根据权利要求156-159中任一项的分离和/或重组的多核苷酸或载体。

161.根据权利要求160的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

162.根据权利要求161的细胞,其中所述细胞是CHO细胞。

163.一种制备BMP10pro多肽的方法,其包括:在适合于表达所述BMP10pro多肽的条件下培养细胞,其中所述细胞包含根据权利要求156-159中任一项的分离和/或重组的多核苷酸或载体。

164.根据权利要求163的方法,其中所述方法还包括回收表达的BMP10pro多肽的步骤。

165.根据权利要求163或164的方法,其中所述细胞是CHO细胞。

166.根据权利要求163-165中任一项的方法,其中使用组织纤溶酶原激活剂信号序列表达所述BMP10pro多肽。

用于治疗心力衰竭的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年2月6日提交的美国临时申请号62/455,266的优先权权益。前述申请的说明书通过引用以其全文并入本文。

背景技术

[0003] 据估计,仅在美国就有超过五百万人患有心力衰竭。美国心脏协会(American Heart Association)的统计数据还表明心力衰竭的新病例以每年550,000例的速率被诊断出。在新诊断的患者中,百分之五十可能在初次诊断后的五年内死亡。当然,这些数字并未将其他国家中也患有心力衰竭的患者人数计入。鉴于这些数字,显然心力衰竭是一个重大的人类危机。

[0004] 心力衰竭是一种如下病症,其部分特征在于心脏使血液循环通过身体的能力降低。通常,潜在的疾病,如血压高(例如,高血压)、动脉阻塞(例如,冠状动脉疾病)、心脏缺陷(例如,心肌病或心脏瓣膜病)或一些其他问题(例如,糖尿病、甲状腺功能亢进或酒精滥用)将导致血液循环随着时间减少。由于心脏工作效率较低,因此其使血液循环的能力下降,并且身体对氧气的需求得不到满足。因为心脏随时间的推移更加努力地工作以补偿效率的降低,所以心肌趋向于增大。

[0005] 治疗通常包括使用许多不同的药剂,包括例如血管紧张素转化(ACE)酶抑制剂、利尿剂、β阻断剂和外科手术。尽管这些治疗可以改善与心力衰竭相关的一些症状,但它们是不完美的,因为许多治疗伴随各种副作用并且在治疗心力衰竭的多种临床表现方面具有有限的功效。心力衰竭唯一的永久性治疗方法是心脏移植。因此,需要用于治疗心力衰竭的另外的治疗剂。

发明内容

[0006] 部分地,本文呈现的数据证明BMP拮抗剂(抑制剂)可以用于治疗心力衰竭。例如,显示可溶性BMP10前肽(BMP10pro)多肽可以用于在横向主动脉缩窄(TAC)心力衰竭模型中预防心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化或者降低心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化的严重程度,以及改善心脏功能。此外,BMP10pro治疗增加了心力衰竭患者的存活时间。在另外的研究中,显示BMP10pro多肽可以在心肌梗塞(MI)心力衰竭模型中预防心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化或者降低心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化的严重程度,以及增加这些患者的存活时间。结合研究证明BMP10pro多肽具有高亲和力并且可以拮抗BMP10的活性。另外,本公开文本的数据显示BMP10pro多肽以高亲和力与BMP9、BMP6和BMP3b结合,并且在较小程度上与BMP5结合。此外,本文所述的实验证明,可溶性内皮糖蛋白多肽可以用于治疗心力衰竭。例如,使用内皮糖蛋白多肽治疗在TAC心力衰竭模型中降低心脏肥大、心脏功能降低和心肌纤维化的严重程度,以及在MI心力衰竭模型中降低心脏肥大、心脏重塑、心脏功能降低和心肌纤维化的严重程度。另外,使用内皮糖蛋白多肽治疗在TAC和MI心力衰竭模型中均增加了患者的存活时间。另外,本公开文本的数据显示内皮糖蛋白多肽以高亲和力与BMP9和

BMP10结合。因此，本公开文本确定BMP信号传导(例如，通过BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种的信号传导)的拮抗剂可以用于治疗心力衰竭。尽管BMP10pro和内皮糖蛋白多肽可以通过除BMP拮抗作用以外的机制影响心力衰竭，但本公开文本证明可以基于BMP信号传导拮抗活性选择需要的治疗剂。因此，在一些实施方案中，本公开文本提供了使用各种BMP信号传导拮抗剂治疗心力衰竭的方法，所述BMP信号传导拮抗剂包括例如，抑制一种或多种BMP配体、特别是BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种的拮抗剂；抑制一种或多种与BMP相互作用的I型、II型或共受体的拮抗剂(例如，ALK1、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和内皮糖蛋白)；抑制一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad蛋白如Smad 2和3)的拮抗剂。如本文所用，此类信号传导拮抗剂统称为“BMP拮抗剂”或“BMP抑制剂”。因此，本公开文本部分地提供了用于治疗心力衰竭、特别是预防心力衰竭的一种或多种并发症(例如，肥大、心脏重塑、纤维化、心脏功能降低)或降低心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度以及降低死于一种或多种心脏并发症(事件)的风险的BMP拮抗剂组合物和方法。根据本公开文本的方法和用途使用的BMP拮抗剂包括例如配体陷阱(trap)(例如，可溶性ActRIIA、ActRIIB、ALK1和内皮糖蛋白多肽)、抗体拮抗剂、小分子拮抗剂和核苷酸拮抗剂。任选地，BMP拮抗剂可以与一种或多种支持疗法和/或另外的活性剂组合地使用以治疗心力衰竭。

[0007] 在某些方面，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的死亡风险(增加存活)的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，患者死亡的风险是任何原因引起的(全因死亡)。在一些实施方案中，患者死亡的风险是心血管事件(并发症)引起的。在一些实施方案中，所述心血管事件包括心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留和心力衰竭进展[例如，按纽约心脏协会(New York Heart Association，NYHA)分类的类别进展或按美国心脏病学会(American College of Cardiology)/美国心脏协会工作组(American Heart Association working group，AAC)分类的阶段进展]中的一种或多种。在一些实施方案中，在心肌梗塞之后将所述BMP拮抗剂给予患者。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的死亡风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂，其中所述BMP拮抗剂是在心肌梗塞之后给予。在一些实施方案中，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的死亡风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂，其中所述BMP拮抗剂是在心肌梗塞之后给予并且所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤35％。在一些实施方案中，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的死亡风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂，其中所述BMP拮抗剂是在心肌梗塞之后给予并且所述患者患有射血分数≤40％(例如，射血分数≤35％)的左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者患有选自以下项的一种或多种病症：系统性高血压、肺动脉高压、糖尿病、肾脏(肾)衰竭(例如急性或慢性肾衰竭)、冠状动脉疾病、高血压、左心室功能不全、心脏瓣膜病、

先天性心脏缺陷、急性缺血性损伤、再灌注损伤、心脏重塑心包障碍、心肌障碍、大血管障碍和心内膜障碍。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照AAC功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0008] 在某些方面，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的住院治疗风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，患者的住院治疗风险是任何原因引起的(全因死亡)。在一些实施方案中，患者的住院死亡是心血管事件(并发症)引起的。在一些实施方案中，所述心血管事件包括心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留和心力衰竭进展[例如，按NYHA分类的类别进展或按AAC分类的阶段进展]中的一种或多种。在一些实施方案中，在心肌梗塞之后将所述BMP拮抗剂给予患者。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的住院治疗风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂，其中所述BMP拮抗剂是在心肌梗塞之后给予。在一些实施方案中，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的住院治疗风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂，其中所述BMP拮抗剂是在心肌梗塞之后给予并且所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤35％。在一些实施方案中，本公开文本涉及降低患有心力衰竭的患者的住院治疗风险的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂，其中所述BMP拮抗剂是在心肌梗塞之后给予并且所述患者患有射血分数≤40％(例如，射血分数≤35％)的左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者患有选自以下项的一种或多种病症：系统性高血压、肺动脉高压、糖尿病、肾脏(肾)衰竭(例如急性或慢性肾衰竭)、冠状动脉疾病、高血压、左心室功能不全、心脏瓣膜病、先天性心脏缺陷、急性缺血性损伤、再灌注损伤、心脏重塑心包障碍、心肌障碍、大血管障碍和心内膜障碍。在一些实施方案中，所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶

(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植],用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0009] 在某些方面,本公开文本涉及改善或降低(延迟)患者的心力衰竭进展的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的II类心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的III类心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的IV类心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的II或III类心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的III或IV类心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的II、III或IV类心力衰竭。在一些实施方案中,所述方法使按照NYHA功能分类系统的患者心力衰竭得分改善了至少一个类别(例如,从IV类到III类心力衰竭、从IV类到II类心力衰竭、从IV类到I类心力衰竭、从III阶段到II阶段心力衰竭、从III阶段到I阶段心力衰竭或从II类到I类心力衰竭的改善)。在一些实施方案中,所述方法使按照NYHA功能分类系统的患者心力衰竭得分的进展降低了至少一个类别(例如,阻止或延迟从I类到II类心力衰竭的进展、延迟从I类到III类心力衰竭的进展、延迟从I类到IV类心力衰竭的进展、延迟从II类到III类心力衰竭的进展、延迟从II类到IV类心力衰竭的进展或延迟从III类到IV类心力衰竭的进展)。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的B阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的C阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的D阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的B或C阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的C或D阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述患者患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的B、C或D阶段心力衰竭。在一些实施方案中,所述方法使按照ACC功能分类系统的患者心力衰竭得分改善了至少一个阶段(例如,从D阶段到C阶段心力衰竭、从D阶段到B阶段心力衰竭、从D阶段到A阶段心力衰竭、从C阶段到B阶段心力衰竭、从C阶段到A阶段心力衰竭或从B阶段到A阶段心力衰竭的改善)。在一些实施方案中,所述方法使按照ACC功能分类系统的患者心力衰竭得分的进展降低了至少一个阶段(例如,阻止或延迟从A阶段到B阶段心力衰竭的进展、延迟从A阶段到C阶段心力衰竭的进展、延迟从A阶段到D阶段心力衰竭的进展、延迟从B阶段到C阶段心力衰竭的进展、延迟从B阶段到D阶段心力衰竭的进展或延迟从C阶段到D阶段心力衰竭的进展)。在一些实施方案中,所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中,所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中,所述患者的射血分数为≤40%。在一些实施方案中,所述患者的射血分数为≤35%。在一些实施方案中,患者患有选自以下项的一

种或多种类型的心力衰竭:由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中,所述患者患有选自以下项的一种或多种病症:系统性高血压、肺动脉高压、糖尿病、肾脏(肾)衰竭(例如急性或慢性肾衰竭)、冠状动脉疾病、高血压、左心室功能不全、心脏瓣膜病、先天性心脏缺陷、急性缺血性损伤、再灌注损伤、心脏重塑心包障碍、心肌障碍、大血管障碍和心内膜障碍。在一些实施方案中,向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如,肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植],用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0010] 在一些实施方案中,本公开文本涉及降低患者的心血管事件(并发症)的发生率的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中,心血管事件是心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留、心力衰竭进展中的一种或多种。在一些实施方案中,所述心血管事件是以下项中的一种或多种:呼吸困难、端坐呼吸、阵发性夜间呼吸困难、疲劳、液体潴留、肺充血、水肿、外周性水肿、心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌病、心脏肥大、肾血流量减少、肾功能不全、心肌梗塞、心脏重塑、心肌纤维化、心脏高血压、心脏壁应力、心脏炎症、心脏压力过载、心脏容量过载、中风、心腔扩张、心室球形度增加、间质纤维化、血管周纤维化、心肌细胞肥大、心源性哮喘、夜尿症、腹水、充血性肝病、凝血病、急性缺血性损伤、再灌注损伤、左心室功能受损和右心室功能受损。在一些实施方案中,所述心血管事件将导致患者住院治疗。可以由本领域技术人员(例如,医师、特别是急诊医师和心脏病专家)确定患者是否应因心血管事件而住院治疗。在一些实施方案中,所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中,所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中,所述患者患有心肌纤维化。在一些实施方案中,所述患者有心脏肥大。在一些实施方案中,所述患者患有心脏重塑。在一些实施方案中,所述患者患有心功能障碍(例如,射血分数≤40%或≤35%)。在一些实施方案中,所述患者是高血压患者。在一些实施方案中,向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如,肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植],用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0011] 在一些实施方案中,本公开文本涉及治疗、预防患者的心肌纤维化或者降低患者的心肌纤维化的严重程度的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。

在一些实施方案中，所述患者患有心力衰竭。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数≤35％。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0012] 在一些实施方案中，本公开文本涉及治疗、预防患者的心肌肥大或者降低患者的心脏肥大的严重程度的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，所述心脏肥大是向心性肥大。在一些实施方案中，所述心脏肥大是离心性肥大。在一些实施方案中，所述患者同时患有向心性肥大和离心性肥大。在一些实施方案中，所述患者患有心力衰竭。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数≤35％。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或

心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0013] 在一些实施方案中，本公开文本涉及治疗、预防患者的心脏重塑或者降低患者的心脏重塑的严重程度的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，所述心脏重塑是心室重塑。在一些实施方案中，所述心脏重塑是心室扩张。在一些实施方案中，所述方法减少了室间隔重塑。在一些实施方案中，所述方法减少了舒张末期室间隔。在一些实施方案中，所述方法减少了后壁重塑。在一些实施方案中，所述方法减少了舒张末期后壁。在一些实施方案中，所述患者患有心力衰竭。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数≤35％。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0014] 在一些实施方案中，本公开文本涉及治疗、预防患者的心功能障碍或者降低患者的心功能障碍的严重程度的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，所述方法增加了心脏射血分数。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数≤35％。在一些实施方案中，所述方法使心脏射血分数增加至少5％(例如，至少5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、50％、60％、65％或更多)。在一些实施方案中，所述方法减少了等容舒张时间。在一些实施方案中，所述方法使等容舒张时间减少至少2ms(例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多ms)。在一些实施方案中，其中所述方法增加了短轴缩短率。在一些实施方案中，所述方法使短轴缩短率增加至少5％(例如，至少5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、50％或更多)。在一些实施方案中，所述患者患有心力衰竭。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一

些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0015] 在一些实施方案中，本公开文本涉及治疗、预防患者的高血压或者降低患者的高血压的严重程度的方法，所述方法包括向有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，所述方法降低了患者的血压。在一些实施方案中，所述方法降低了收缩压。在一些实施方案中，所述方法使收缩压降低至少4mm Hg(例如，至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多mm Hg)。在一些实施方案中，所述方法降低了舒张压。在一些实施方案中，所述方法使舒张压降低至少2mm Hg(例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多mm Hg)。在一些实施方案中，所述方法中，将血压测量为静息血压。在一些实施方案中，所述方法中，将血压测量为动态血压。在一些实施方案中，所述患者患有心力衰竭。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positiveinotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0016] 在一些实施方案中，本公开文本涉及治疗、预防心脏病或心脏病的一种或多种并发症或者或降低心脏病或心脏病的一种或多种并发症的严重程度的方法，所述方法包括向

有需要的患者给予有效量的BMP拮抗剂。在一些实施方案中，心脏病的一种或多种并发症是以下项中的一种或多种：呼吸困难、端坐呼吸、阵发性夜间呼吸困难、疲劳、液体潴留、肺充血、水肿、外周性水肿、心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌病、心脏肥大、肾血流量减少、肾功能不全、心肌梗塞、心脏重塑、心肌纤维化、心脏高血压、心脏壁应力、心脏炎症、心脏压力过载、心脏容量过载、中风、心腔扩张、心室球形度增加、间质纤维化、血管周纤维化、心肌细胞肥大、心源性哮喘、夜尿症、腹水、充血性肝病、凝血病、急性缺血性损伤、再灌注损伤、左心室功能受损和右心室功能受损。在一些实施方案中，所述并发症是心肌纤维化。在一些实施方案中，所述并发症是心脏肥大。在一些实施方案中，所述并发症是心脏重塑。在一些实施方案中，所述并发症是心功能障碍(例如，射血分数≤40％或≤35％)。在一些实施方案中，所述并发症是高血压。在一些实施方案中，患者患有选自以下项的一种或多种类型的心力衰竭：由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭、低输出量性心力衰竭和心肌水肿。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照纽约心脏协会(NYHA)功能分类的I类心力衰竭(I类、II类、III类或IV类)。在一些实施方案中，所述患者至少患有按照美国心脏病学会/美国心脏协会工作组(AAC)功能分类的A阶段心力衰竭(A阶段、B阶段、C阶段或D阶段)。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者先前患有心肌梗塞。在一些实施方案中，所述患者患有左心室收缩功能不全。在一些实施方案中，所述患者的射血分数为≤40％。在一些实施方案中，所述患者的射血分数≤35％。在一些实施方案中，向患者进一步给予一种或多种另外的活性剂或支持疗法[例如，肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物(positive inotrope)、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂、利尿剂、起搏器、植入式心脏除颤器、心脏收缩力调节、心脏再同步疗法、心室辅助装置、双心室心脏再同步疗法和心脏移植]，用于治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度。

[0017] 在某些方面，根据本文描述的方法和用途使用的BMP拮抗剂是抑制BMP10的药剂(BMP10拮抗剂)。可以例如使用基于细胞的测定来确定对BMP10抑制的作用，所述测定包括本文所述的那些(例如，Smad信号传导报告基因测定)。此类基于细胞的测定可以用于确定其他BMP拮抗剂(包括本文所述的那些)的抑制作用。因此，在一些实施方案中，BMP10拮抗剂可以与BMP10结合。配体结合活性可以例如使用结合亲和力测定(包括例如本文所述的那些)来测定。此类配体结合测定可以用于测定其他BMP拮抗剂(包括本文所述的那些)的结合亲和力。在一些实施方案中，BMP10拮抗剂以至少1x 10^{-8}M(例如，至少1x 10^{-9}M、至少1x 10^{-10}M、至少1x 10^{-11}M或至少1x 10^{-12}M)的K_D与BMP10结合。在一些实施方案中，BMP10拮抗剂还抑制BMP9的活性。在一些实施方案中，所述BMP10拮抗剂还抑制BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种。因此，在一些实施方案中，BMP10拮抗剂可以与BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种结合。本文描述了BMP10拮抗剂的例子，并且其包括例如配体陷阱(例如，TGFβ受体超家族的I型、II型或共受体的可溶性配体结合结构域)、抗体、小分子和多核苷酸。在一些实施

方案中,BMP10拮抗剂还可以抑制TGFβ超家族的一种或多种I型、II型或共受体和/或信号传导介质(例如,Smad)。

[0018] 在某些方面,根据本文描述的方法和用途使用的BMP拮抗剂是抑制BMP9的药剂(BMP9拮抗剂)。因此,在一些实施方案中,BMP9拮抗剂可以与BMP9结合。在一些实施方案中,BMP9拮抗剂以至少1x 10^{-8}M(例如,至少1x 10^{-9}M、至少1x 10^{-10}M、至少1x 10^{-11}M或至少1x 10^{-12}M)的K_D与BMP9结合。在一些实施方案中,BMP9拮抗剂还抑制BMP10的活性。在一些实施方案中,所述BMP9拮抗剂还抑制BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种。因此,在一些实施方案中,BMP9拮抗剂可以与BMP10、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种结合。本文描述了BMP9拮抗剂的例子,并且其包括例如配体陷阱(例如,TGFβ受体超家族的I型、II型或共受体的可溶性配体结合结构域)、抗体、小分子和多核苷酸。在一些实施方案中,BMP9拮抗剂还可以抑制TGFβ超家族的一种或多种I型、II型或共受体和/或信号传导介质(例如,Smad)。

[0019] 在某些方面,根据本文描述的方法和用途使用的BMP拮抗剂是抑制BMP6的药剂(BMP6拮抗剂)。因此,在一些实施方案中,BMP6拮抗剂可以与BMP6结合。在一些实施方案中,BMP6拮抗剂以至少1x 10^{-8}M(例如,至少1x 10^{-9}M、至少1x 10^{-10}M、至少1x 10^{-11}M或至少1x 10^{-12}M)的K_D与BMP6结合。在一些实施方案中,BMP6拮抗剂还抑制BMP10和/或BMP9的活性。在一些实施方案中,所述BMP6拮抗剂还抑制BMP3b和/或BMP5。因此,在一些实施方案中,BMP6拮抗剂可以与BMP10、BMP9、BMP3b和BMP5中的一种或多种结合。本文描述了BMP6拮抗剂的例子,并且其包括例如配体陷阱(例如,TGFβ受体超家族的I型、II型或共受体的可溶性配体结合结构域)、抗体、小分子和多核苷酸。在一些实施方案中,BMP6拮抗剂还可以抑制TGFβ超家族的一种或多种I型、II型或共受体和/或信号传导介质(例如,Smad)。

[0020] 在某些方面,根据本文描述的方法和用途使用的BMP拮抗剂是抑制BMP3b的药剂(BMP3b拮抗剂)。因此,在一些实施方案中,BMP3b拮抗剂可以与BMP3b结合。在一些实施方案中,BMP3b拮抗剂以至少1x 10^{-8}M(例如,至少1x 10^{-9}M、至少1x 10^{-10}M、至少1x 10^{-11}M或至少1x 10^{-12}M)的K_D与BMP3b结合。在一些实施方案中,BMP3b拮抗剂还抑制BMP10和/或BMP9的活性。在一些实施方案中,所述BMP3b拮抗剂还抑制BMP6和/或BMP5。因此,在一些实施方案中,BMP3b拮抗剂可以与BMP10、BMP9、BMP6和BMP5中的一种或多种结合。本文描述了BMP3b拮抗剂的例子,并且其包括例如配体陷阱(例如,TGFβ受体超家族的I型、II型或共受体的可溶性配体结合结构域)、抗体、小分子和多核苷酸。在一些实施方案中,BMP3b拮抗剂还可以抑制TGFβ超家族的一种或多种I型、II型或共受体和/或信号传导介质(例如,Smad)。

[0021] 在某些方面,根据本文描述的方法和用途使用的BMP拮抗剂是抑制BMP5的药剂(BMP5拮抗剂)。因此,在一些实施方案中,BMP5拮抗剂可以与BMP5结合。在一些实施方案中,BMP5拮抗剂以至少1x 10^{-8}M(例如,至少1x 10^{-9}M、至少1x 10^{-10}M、至少1x 10^{-11}M或至少1x 10^{-12}M)的K_D与BMP5结合。在一些实施方案中,BMP5拮抗剂还抑制BMP10和/或BMP9的活性。在一些实施方案中,所述BMP5拮抗剂还抑制BMP6和/或BMP5。因此,在一些实施方案中,BMP5拮抗剂可以与BMP10、BMP9、BMP6和BMP3b中的一种或多种结合。本文描述了BMP5拮抗剂的例子,并且其包括例如配体陷阱(例如,TGFβ受体超家族的I型、II型或共受体的可溶性配体结合结构域)、抗体、小分子和多核苷酸。在一些实施方案中,BMP5拮抗剂还可以抑制TGFβ超家族的一种或多种I型、II型或共受体和/或信号传导介质(例如,Smad)。

[0022] 在某些方面,根据本文描述的方法和用途使用的BMP拮抗剂是抑制BMP10、BMP9、

BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种的一种或多种受体或信号传导介质的药剂。例如，在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制ActRIIA。在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制ActRIIB。在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制ActRIIA和ActRIIB。在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制BMPRII。在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制ALK1。在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制内皮糖蛋白。在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以抑制一种或多种Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)。因此，在一些实施方案中，BMP拮抗剂可以与ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、内皮糖蛋白和Smad蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，BMP拮抗剂以至少1x 10^{-8}M(例如，至少1x 10^{-9}M、至少1x 10^{-10}M、至少1x 10^{-11}M或至少1x 10^{-12}M)的K_D与ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、内皮糖蛋白和Smad蛋白中的一种或多种结合。本文描述了ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、内皮糖蛋白和Smad蛋白拮抗剂的例子，其包括例如抗体、小分子和多核苷酸。

[0023] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂是ActRII多肽。术语“ActRII多肽”共同地指天然存在的ActRIIA和ActRIIB多肽以及其截短物和变体，如本文所述的那些截短物和变体。优选地，ActRII多肽包含ActRII多肽或其经修饰的(变体)形式的配体结合结构域。例如，在一些实施方案中，ActRIIA多肽可以包含ActRIIA的细胞外结构域。类似地，ActRIIB多肽可以包含ActRIIB的细胞外结构域。优选地，根据本文描述的方法和用途使用的ActRII多肽是可溶性多肽。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与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。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与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。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸30-110的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:50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。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ IDNO:54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。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:57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。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO:1的氨基酸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。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸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。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO: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。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与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。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO: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。在一些实施方案

中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:6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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO: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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:133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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO:58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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:60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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO:63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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:66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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:123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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:131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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:132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。在一些实施方案中,ActRIIB多肽不包含在关于SEQ ID NO:1的位置79处的酸性氨基酸(例如,人工酸性氨基酸或天然存在的酸性氨基酸,如D或E)。

[0024] 在某些方面,本公开文本的BMP拮抗剂是BMPRII多肽。术语BMPRII多肽共同地指天然存在的多肽以及其截短物和变体,如本文所述的那些截短物和变体。优选地,BMPRII多肽包含BMPRII多肽或其经修饰的(变体)形式的配体结合结构域。例如,在一些实施方案中,BMPRII多肽可以包含BMPRII的细胞外结构域。优选地,根据本文描述的方法和用途使用的BMPRII多肽是可溶性多肽。在一些实施方案中,BMPRII多肽可以包含与SEQ ID NO:14的氨基酸27-150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。在一些实施方案中,BMPRII多肽可以包含与SEQ ID NO:14的氨基酸34-123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。在一些实施方案中,BMPRII多肽可以包含与SEQ ID NO:15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。在一些实施方案中,BMPRII多肽可以包含与SEQ ID NO:69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。在一些实施方案中,BMPRII多肽可以包含与SEQ ID NO:71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。

[0025] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂是ALK1多肽。术语ALK1多肽共同地指天然存在的多肽以及其截短物和变体，如本文所述的那些截短物和变体。优选地，ALK1多肽包含ALK1多肽或其经修饰的(变体)形式的配体结合结构域。例如，在一些实施方案中，ALK1多肽可以包含ALK1的细胞外结构域。优选地，根据本文描述的方法和用途使用的ALK1多肽是可溶性多肽。在一些实施方案中，ALK1多肽可以包含与SEQ ID NO:20的氨基酸22-118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。在一些实施方案中，ALK1多肽可以包含与SEQ ID NO:20的氨基酸34-95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。在一些实施方案中，ALK1多肽可以包含与SEQ ID NO:21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。在一些实施方案中，ALK1多肽可以包含与SEQ ID NO:74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。在一些实施方案中，ALK1多肽可以包含与SEQ ID NO:76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。

[0026] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂是内皮糖蛋白多肽。术语内皮糖蛋白多肽共同地指天然存在的多肽以及其截短物和变体，如本文所述的那些截短物和变体。优选地，内皮糖蛋白多肽包含内皮糖蛋白多肽或其经修饰的(变体)形式的配体结合结构域。例如，在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含内皮糖蛋白的细胞外结构域。优选地，根据本文描述的方法和用途使用的内皮糖蛋白多肽是可溶性多肽。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:24的氨基酸26-378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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:24的氨基酸42-333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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:24的氨基酸26-346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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:24的氨基酸27-581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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:24的氨基酸26-359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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:80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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:28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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:29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。在一

些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:30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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽可以包含与SEQ ID NO:31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。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽不包含由SEQ ID NO:24的氨基酸379-430组成的序列。在一些实施方案中，内皮糖蛋白多肽不包含来自由SEQ ID NO:24的氨基酸379-586组成的序列的超过50个连续氨基酸的。

[0027] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂是BMP10前肽(BMP10pro)多肽。术语BMP10pro多肽共同地指天然存在的前肽多肽以及其截短物和变体，如本文所述的那些截短物和变体。优选地，BMP10pro多肽包含BMP10前肽多肽或其经修饰的(变体)形式的配体结合结构域。优选地，根据本文描述的方法和用途使用的BMP10pro多肽是可溶性多肽。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸291-295的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸291-294的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-291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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-291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，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-294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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-294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，其中所述多肽不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸291-291的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R295。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸291-294的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R295。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-291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，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R295。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-294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，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R295。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:82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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:84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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:85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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:87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。

[0028] 在某些方面，BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和内皮糖蛋白多肽(包括其变体)可以是融合蛋白。例如，在一些实施方案中，BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽或内皮糖蛋白多肽可以是包含BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽或内皮糖蛋白多肽结构域和一个或多个异源(非BMP10pro、非ActRII、非BMPRII、非ALK1或非内皮糖蛋白)多肽结构域的融合蛋白。在一些实施方案中，BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽或内皮糖蛋白多肽可以是如下融合蛋白，所述融合蛋白具有作为一个结构域(例如，BMP前肽、ActRII受体、BMPRII受体、ALK1受体或内皮糖蛋白受体或其变体的配体结合结构域)的源自BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽或内皮糖蛋白多肽的氨基酸序列和提供所需特性(如改善的药代动力学、更简单的纯化、靶向特定组织等)的一个或多个异源结构域。例如，融合蛋白的结构域可以增强体内稳定性、体内半衰期、摄取/给予、组织定位或分布、蛋白质复合物的形成、融合蛋白的多聚化和/或纯化中的一种或多种。任选地，融合蛋白的BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽或内皮糖蛋白多肽结构域与一个或多个异源多肽结构域直接地连接(融合)，或者间插序列如接头可以位于所述BMP10pro多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽或内皮糖蛋白多肽的氨基酸序列与所述一个或多个异源结构域的氨基酸序列之间。在某些实施方案中，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白多肽融合物包含位于异源结构域与BMP10pro结构域、ActRII结构域、BMPRII结构域、ALK1结构域或内皮糖蛋白结构域之间的接头。所述接头可以对应于所述BMP10pro结构域、ActRII结构域、BMPRII结构域、ALK1结构域或内皮糖蛋白结构域的C末端处约4-15个氨基酸非结构化区，或者所述接头可以是3与15、20、30、50或更多个相对不含二级结构的氨基酸之间的人工序列。接头可以富含甘氨酸和脯氨酸残基，并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列。接头的例子包括但不限于序列TGGG(SEQ ID NO:45)、SGGG(SEQ ID NO:46)、TGGGG(SEQ ID NO:43)、SGGGG(SEQ ID NO:44)、GGGGS(SEQ ID NO:47)、GGGG(SEQ ID NO:42)和GGG(SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白融合蛋白可以包含免疫球蛋白的恒定结构域，包括例如免疫球蛋白的Fc部分。例如，衍生自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM免疫球蛋白的Fc结构域的氨基酸序列。例如，免疫球蛋白结构域的Fc部分可以包含与SEQ ID NO:36-40中的任何一个至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，基本上由所述氨

基酸序列组成，或由所述氨基酸序列组成。此类免疫球蛋白结构域可以包含一个或多个氨基酸修饰(例如，缺失、添加和/或取代)，所述修饰赋予经改变的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，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白融合蛋白包含如式A-B-C中所示的氨基酸序列。例如，所述B部分是如本文所述的N和C末端截短的BMP10pro多肽。A部分和C部分可以独立地是零个、一个或超过一个氨基酸，并且A部分和C部分二者对于B都是异源的。A部分和/或C部分可以通过接头序列附接至B部分。在某些实施方案中，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白融合蛋白包含前导序列。所述前导序列可以是天然BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白前导序列或异源前导序列。在某些实施方案中，前导序列是组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[0029] BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白多肽(包括其变体)可以包含纯化子序列，如表位标签、FLAG标签、多组氨酸序列和GST融合物。任选地，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白多肽包含一个或多个经修饰的氨基酸残基，所述一个或多个经修饰的氨基酸残基选自：糖基化氨基酸、PEG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与有机衍生剂缀合的氨基酸。BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白多肽可以包含至少一种N-连接糖，并且可以包含两种、三种或更多种N-连接糖。此类多肽也可以包含O-连接糖。一般而言，优选BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白多肽在哺乳动物细胞系中表达，所述哺乳动物细胞系适当地介导所述多肽的天然糖基化，从而减小患者中不利的免疫应答的可能性。BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白多肽可以在多种细胞系中产生，所述细胞系以适合于患者使用的方式糖基化所述蛋白质，所述细胞系包括工程化昆虫或酵母细胞以及哺乳动物细胞如COS细胞、CHO细胞、HEK细胞和NSO细胞。在一些实施方案中，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白多肽被糖基化并且具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白多肽在哺乳动物(例如，小鼠或人)中展现出至少4、6、12、24、36、48或72小时的血清半衰期。任选地，BMP10pro、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白多肽可以在哺乳动物(例如，小鼠或人)中展现出至少6、8、10、12、14、20、25或30天的血清半衰期。

[0030] 在某些方面，根据本公开文本的传授使用的BMP拮抗剂是抗体或抗体的组合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMP10结合。在一些实施方案中，与BMP10结合的抗体或抗体的组合还与BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMP9结合。在一些实施方案中，与BMP9结合的抗体或抗体的组合还与BMP10、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMP6结合。在一些实施方案中，与BMP6结合的抗体或抗体的组合还与BMP9、BMP10、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMP3b结合。在一些实施方案中，与BMP10结合的抗体或抗体的组合还与BMP9、BMP6、BMP10、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMP5结合。在一些实施方案中，与BMP5结合的抗体或抗体的组合还与BMP9、BMP6、BMP3b、BMP10、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与ActRII结合。在一些

实施方案中，与ActRII结合的抗体或抗体的组合还与BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMPRII结合。在一些实施方案中，与BMPRII结合的抗体或抗体的组合还与BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与ALK1结合。在一些实施方案中，与ALK1结合的抗体或抗体的组合还与BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与内皮糖蛋白结合。在一些实施方案中，与内皮糖蛋白结合的抗体或抗体的组合还与BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII和ALK1中的一种或多种结合。在一些实施方案中，所述抗体或抗体的组合至少与BMP10和BMP9结合。在一些实施方案中，与BMP10和BMP9结合的抗体或抗体的组合还与BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种结合。在某些优选的实施方案中，本文公开的抗体或抗体的组合抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种的活性。在某些优选的实施方案中，BMP10抗体与成熟BMP10蛋白结合。在某些优选的实施方案中，BMP10抗体与BMP10前肽竞争性地结合成熟BMP10蛋白。

[0031] 在某些方面，根据本公开文本的传授使用的BMP拮抗剂是小分子或小分子的组合。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMP10活性。在一些实施方案中，抑制BMP10活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMP9活性。在一些实施方案中，抑制BMP9活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMP6活性。在一些实施方案中，抑制BMP6活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMP3b活性。在一些实施方案中，抑制BMP3b活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMP5活性。在一些实施方案中，抑制BMP5活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制ActRII活性。在一些实施方案中，抑制ActRII活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMPRII活性。在一些实施方案中，抑制BMPRII活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制ALK1活性。在一些实施方案中，抑制ALK1活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制内皮

糖蛋白活性。在一些实施方案中，抑制内皮糖蛋白活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合抑制至少一种或多种Smad(例如，Smad 2和/或3)活性。在一些实施方案中，抑制一种或多种Smad活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，小分子或小分子的组合至少抑制BMP10和BMP9活性。在一些实施方案中，抑制BMP10和BMP9活性的小分子或小分子的组合还抑制BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。

[0032] 在某些方面，根据本公开文本的传授使用的BMP拮抗剂是核苷酸或核苷酸的组合。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMP10活性。在一些实施方案中，抑制BMP10活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMP9活性。在一些实施方案中，抑制BMP9活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMP6活性。在一些实施方案中，抑制BMP6活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMP3b活性。在一些实施方案中，抑制BMP3b活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMP5活性。在一些实施方案中，抑制BMP5活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制ActRII活性。在一些实施方案中，抑制ActRII活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMPRII活性。在一些实施方案中，抑制BMPRII活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制ALK1活性。在一些实施方案中，抑制ALK1活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制内皮糖蛋白活性。在一些实施方案中，抑制内皮糖蛋白活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、和Smad蛋白(例如，Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合抑制至少一种或多种Smad(例如，Smad 2和/或3)活性。在一些实施方案中，抑制一种或多种Smad活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白中的一种或多种的活性。在一些实施方案中，核苷酸或核苷酸的组合至少抑制BMP10和BMP9活

性。在一些实施方案中，抑制BMP10和BMP9活性的核苷酸或核苷酸的组合还抑制BMP6、BMP3b、BMP5、ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad蛋白(例如Smad 2和/或3)中的一种或多种的活性。

[0033] 在某些方面，本公开文本提供了BMP10前肽。如本文实施例所证明的，已经生成了与成熟BMP10多肽结合并且拮抗成熟BMP10多肽的活性的BMP10前肽。还发现这些BMP10前肽与其他BMP蛋白、特别是BMP9、BMP6和BMP3b结合，并且在较小程度上与BMP5结合。因此，BMP前肽可以拮抗BMP家族的其他成员，因此可以用于治疗与这些其他BMP蛋白相关的另外的障碍或病症(例如，BMP9、BMP6、BMP3b和BMP6相关的障碍或病症)。此外，出人意料地发现，与较长长度的BMP10前肽变体相比，缺乏所述前肽结构域的四个C末端氨基酸的C末端截短的BMP10前肽变体具有增加的BMP10拮抗活性。因此，BMP10前肽可以耐受1、2、3或4个氨基酸的C末端截短而不丧失BMP10拮抗活性。另外，缺乏四个C末端氨基酸的BMP10前肽变体可以具有增加的BMP10拮抗活性，因此可以用于需要此类增加的BMP10拮抗作用的某些实验和临床情况。本公开文本还提供了编码BMP10前肽的核酸序列、包含BMP10前肽的药物组合物和试剂盒以及制备BMP10前肽的方法。

[0034] 在某些方面，本公开文本提供了包含如下氨基酸序列的BMP10前肽(BMP10pro)多肽，所述氨基酸序列与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施方案中，BMP10pro多肽不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。在一些实施方案中，BMP10pro多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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，其中多肽不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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，其中所述多肽的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。在一些实施方案中，BMP10pro多肽包含与SEQID NO:34的氨基酸1-295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。在一些实施方案中，BMP10pro多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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，其中多肽不包含氨基酸RIRR的序列。

[0035] 在一些实施方案中，BMP10pro多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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，其中所述多肽的C末端不是SEQID NO:34的R296。

[0036] 如前所述，本公开文本提供了BMP10pro多肽，其是包含BMP10pro多肽结构域和一个或多个异源非BMP10pro多肽结构域的融合蛋白。例如，BMP10pro多肽是包含BMP10pro多肽结构域和免疫球蛋白Fc结构域的Fc融合蛋白。任选地，融合蛋白的BMP10pro多肽结构域与一个或多个异源多肽结构域直接地连接(融合)，或者间插序列如接头可以位于所述

BMP10pro多肽的氨基酸序列与所述一个或多个异源结构域的氨基酸序列之间。在某些实施方案中，BMP10pro多肽融合物包含位于异源结构域与BMP10pro结构域之间的接头。所述接头可以对应于所述BMP10pro结构域的C末端处约4-15个氨基酸非结构化区，或者所述接头可以是3与15、20、30、50或更多个相对不含二级结构的氨基酸之间的人工序列。接头可以富含甘氨酸和脯氨酸残基，并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的重复序列。接头的例子包括但不限于序列TGGG(SEQ ID NO:45)、SGGG(SEQ ID NO:46)、TGGGG(SEQID NO:43)、SGGGG(SEQ ID NO:44)、GGGGS(SEQ ID NO:47)、GGGG(SEQ ID NO:42)和GGG(SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中，BMP10pro内皮糖蛋白融合蛋白可以包含免疫球蛋白的恒定结构域，包括例如免疫球蛋白的Fc部分。例如，衍生自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM免疫球蛋白的Fc结构域的氨基酸序列。例如，免疫球蛋白结构域的Fc部分可以包含与SEQ ID NO:36-40中的任何一个至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。此类免疫球蛋白结构域可以包含一个或多个氨基酸修饰(例如，缺失、添加和/或取代)，所述修饰赋予经改变的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，BMP10pro融合蛋白包含如式A-B-C中所示的氨基酸序列。例如，所述B部分是如本文所述的N和C末端截短的BMP10pro多肽。A部分和C部分可以独立地是零个、一个或超过一个氨基酸，并且A部分和C部分二者对于B都是异源的。A部分和/或C部分可以通过接头序列附接至B部分。在某些实施方案中，BMP10pro融合蛋白包含前导序列。所述前导序列可以是天然BMP10pro前导序列或异源前导序列。在某些实施方案中，前导序列是组织型纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[0037] 在某些方面，本公开文本提供了BMP10pro多肽，其是包含BMP10pro多肽结构域和免疫球蛋白Fc结构域的Fc融合蛋白。在某些方面，本公开文本提供了包含如下氨基酸序列的BMP10pro-Fc融合蛋白，所述氨基酸序列与在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6的任何一个的位置处开始并且在对应于SEQID NO:34的氨基酸292-295的任何一个的位置处结束的序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白的BMP10pro结构域的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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，其中多肽不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQID NO:34的氨基酸1-292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，其中所述BMP10pro结构域的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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，其中BMP10pro结构域不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含

与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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，其中所述BMP10pro结构域的C末端不是SEQ IDNO:34的R296。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ IDNO:82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。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:82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，其中所述融合蛋白不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:82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，其中所述BMP10pro结构域的C末端不是SEQ ID NO:34的R296。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:87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。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:87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，其中所述融合蛋白不包含氨基酸RIRR的序列。在一些实施方案中，BMP10pro-Fc融合蛋白包含与SEQ ID NO:87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，其中所述BMP10pro结构域的C末端不是SEQ IDNO:34的R296。

[0038] BMP10pro多肽(包括其变体)可以包含纯化子序列，如表位标签、FLAG标签、多组氨酸序列和GST融合物。任选地，BMP10pro多肽包含一个或多个修饰的氨基酸残基，所述一个或多个修饰的氨基酸残基选自：糖基化氨基酸、PEG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与有机衍生剂缀合的氨基酸。BMP10pro多肽可以包含至少一种N-连接糖，并且可以包含两种、三种或更多种N-连接糖。此类多肽也可以包含O-连接糖。一般而言，优选BMP10pro多肽在哺乳动物细胞系中表达，所述哺乳动物细胞系适当地介导所述多肽的天然糖基化，从而减小患者中不利的免疫应答的可能性。BMP10pro多肽可以在多种细胞系中产生，所述细胞系以适合于患者使用的方式糖基化所述蛋白质，所述细胞系包括工程化昆虫或酵母细胞以及哺乳动物细胞如COS细胞、CHO细胞、HEK细胞和NSO细胞。在一些实施方案中，BMP10pro多肽被糖基化并且具有可从中国仓鼠卵巢细胞系获得的糖基化模式。在一些实施方案中，BMP10pro多肽在哺乳动物(例如，小鼠或人)中展现出至少4、6、12、24、36、48或72小时的血清半衰期。任选地，BMP10pro可以在哺乳动物(例如，小鼠或人)中展现出至少6、8、10、12、14、20、25或30天的血清半衰期。

[0039] 在某些方面，本公开文本提供了编码BMP10前肽的核酸，其不编码BMP10的完整的可翻译的成熟部分。分离的和/或重组的多核苷酸可以包含BMP10前肽的编码序列，如上所述。分离的核酸可以包括编码BMP10前肽的序列和编码部分或全部成熟部分的序列，但不包括编码位于成熟部分内或位于所述前肽与所述成熟部分之间的终止密码子的序列。在一些实施方案中，本公开文本提供了与SEQ ID NO:83的核酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列。在一些实施方案中，本公开文本提供了与SEQ ID NO:86的核酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸序列。本文公

开的核酸可以与用于表达的启动子可操作地连接，并且本公开文本提供了包含此类多核苷酸的载体以及用此类多核苷酸转化的细胞。优选地，所述细胞是哺乳动物细胞，如CHO细胞。

[0040] 在某些方面，本公开文本提供了制备BMP10前肽的方法。这种方法可以包括在合适的细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达任何本文公开的前肽编码核酸。这种方法可以包括在适合于表达所述前肽的条件下培养细胞，其中所述细胞包含BMP10前肽表达构建体。所述方法还可以包括回收所述前肽表达的BMP10前肽的步骤。BMP10前肽可以使用任何公知的用于从细胞培养物获得蛋白质的技术作为粗制、部分纯化或高度纯化的级分回收。

[0041] 在某些方面，本公开文本提供了BMP10前肽用于制备如下药物的用途，所述药物用于预防、治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度，以及用于本文所述的其他心脏相关用途。在某些方面，本公开文本提供了BMP10前肽用于预防、治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度以及本文所述的其他心脏相关用途。

[0042] 在某些方面，本公开文本提供了用于鉴定可用于治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的药剂的方法。方法可以包括：a)鉴定与BMP10前肽竞争性地结合成熟BMP10多肽的测试剂；和b)评价所述药剂对心脏障碍的作用。测试剂可以是例如变体BMP10前肽、抗体或小分子。

[0043] 在某些方面，本公开文本提供了包含BMP10pro多肽和药学上可接受的载体的药物制剂(组合物)。包含BMP10pro多肽的药物制剂还可以包含一种或多种另外的活性剂，如用于治疗或预防本文所述的障碍或病症[例如，心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症]的化合物。在一些实施方案中，包含BMP10pro多肽的药物制剂将是无热原的(例如，无热原达到管理用于治疗用途的产品质量的规范所要求的程度)。

附图说明

[0044] 图1示出了人ActRIIB和人ActRIIA的细胞外结构域的比对，其中在本文基于多种ActRIIB和ActRIIA晶体结构的综合分析推断直接接触配体的残基用框指示。

[0045] 图2示出了多种脊椎动物ActRIIB蛋白(SEQ ID NO:100-105)和人ActRIIA(SEQ ID NO:122)的多序列比对以及衍生自所述比对的共有ActRII序列(SEQ ID NO:106)。

[0046] 图3示出了多种脊椎动物ActRIIA蛋白和人ActRIIA(SEQ ID NO:107-114)的多序列比对。

[0047] 图4示出了使用Clustal 2.1获得的来自人IgG同种型的Fc结构域的多序列比对。铰链区域由虚线下划线表示。双下划线表示在IgG1Fc中工程化以促进不对称链配对的位置和关于其他同种型IgG2、IgG3和IgG4的相应位置的例子。

[0048] 图5示出了ActRIIB(25-131)-hFc的完整未加工的氨基酸序列(SEQ IDNO:123)。TPA前导序列(残基1-22)和双重截短的ActRIIB细胞外结构域(残基24-131，使用基于SEQ ID NO:1中的天然序列的编号)各自加下划线。突出显示通过测序揭示是成熟融合蛋白的N末端氨基酸的谷氨酸，其相对于SEQ ID NO:1位于位置25。

[0049] 图6示出了编码ActRIIB(25-131)-hFc的核苷酸序列(所述编码链示于顶部，SEQ ID NO:124，并且所述互补体示于底部3'-5'，SEQ ID NO:125)。编码TPA前导序列(核苷酸1-66)和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸73-396)的序列加下划线。还示出了ActRIIB(25-131)

的相应氨基酸序列。

[0050] 图7显示了编码ActRIIB(25-131)-hFc的替代核苷酸序列(所述编码链示于顶部，SEQ ID NO:126,并且所述互补体示于底部3'-5',SEQ ID NO:127)。这个序列使得初始转化体中的蛋白质表达水平更高,从而使细胞系研发过程更加快速。编码TPA前导序列(核苷酸1-66)和ActRIIB细胞外结构域(核苷酸73-396)的序列标是加下划线的,并且突出显示ECD的野生型核苷酸序列中的取代(参见图6)。还示出了ActRIIB(25-131)的相应氨基酸序列。

[0051] 图8示出了截短的GDF陷阱ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的完整氨基酸序列(SEQ ID NO:131),包括TPA前导序列(双下划线)、截短的ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131;单下划线)和hFc结构域。在天然序列中的位置79处取代的天冬氨酸加双下划线并突出显示,通过测序揭示是成熟融合蛋白中的N末端残基的谷氨酸也加双下划线并突出显示。

[0052] 图9示出了截短的GDF陷阱ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的氨基酸序列(SEQ ID NO:132),其中不含前导序列。截短的ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131)加下划线。在天然序列中的位置79处取代的天冬氨酸加双下划线并突出显示,通过测序揭示是成熟融合蛋白中的N末端残基的谷氨酸也加双下划线并突出显示。

[0053] 图10示出了截短的GDF陷阱ActRIIB(L79D 25-131)的氨基酸序列(SEQ ID NO:133),其中不含前导序列、hFc结构域和接头。在天然序列中的位置79处取代的天冬氨酸加下划线并突出显示,通过测序揭示是成熟融合蛋白中的N末端残基的谷氨酸也加下划线并突出显示。

[0054] 图11示出了编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的核苷酸序列。SEQ ID NO:134对应于有义链,并且SEQ ID NO:135对应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)加双下划线,并且截短的ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-396)加单下划线。还示出了ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131)的氨基酸序列。

[0055] 图12示出了编码ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的替代核苷酸序列。SEQ ID NO:136对应于有义链,并且SEQ ID NO:137对应于反义链。TPA前导序列(核苷酸1-66)加双下划线,截短的ActRIIB细胞外结构域(核苷酸76-396)加下划线,并且细胞外结构域的野生型核苷酸序列中的取代加双下划线并突出显示。还示出了ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1中的残基25-131)的氨基酸序列。

[0056] 图13示出了hENG-Fc融合构建体的结构域结构。全长ENG细胞外结构域(顶部结构中的残基26-586)由孤儿结构域和N末端和C末端透明带(ZP)结构域组成。下面示出了所选截短变体的结构,以及它们是否在基于SPR的测定中展现出与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合(+/-)。

[0057] 图14示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对心脏肥大的影响。比较来自假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物的心脏重量与体重之比(HW/BW;mg/g)。与假手术的动物相比,TAC-PBS对照动物显示出明显的心脏肥大。在心

力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理抑制心脏肥大。(*)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0058] 图15示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对舒张末期室间隔厚度的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物中舒张末期的室间隔厚度。与假手术动物相比，TAC-PBS小鼠显示出增加的舒张末期室间隔(LVSdmm)。在心力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理显著地降低了舒张末期室间隔。(*)和(#)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0059] 图16示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对舒张末期左心室后壁厚度的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物中舒张末期的左心室后壁厚度。与假手术动物相比，TAC-PBS小鼠显示出增加的舒张末期左心室后壁(LVPTd mm)。在心力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理显著地降低了舒张末期左心室后壁。(*)和(#)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0060] 图17示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对短轴缩短率的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物中左心室舒张末期直径和左心室收缩末期直径。使用以下等式：FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]从舒张末期直径(EDD)和收缩末期直径(ESD)计算短轴缩短率(FS)。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比减小了约20％的短轴缩短率。在心力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理显著地增加了舒张期短轴缩短率。(*)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0061] 图18示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对射血分数的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物中舒张末期容积(EDD)和收缩末期容积(ESD)。使用以下等式：EF％＝(EDV-ESV)/EDV计算射血分数(EF)。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比减小的射血分数。在心力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理显著地增加了射血分数。(*)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0062] 图19示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对等容舒张时间的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物中的等容舒张时间(IVRT ms)。TAC+PBS小鼠显示出与假手术动物相比增加的IVRT。在心力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理显著地减小了IVRT。(*)和(#)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0063] 图20示出了在小鼠TAC模型中BMP10pro(22-312)-Fc对心肌纤维化的影响。从假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物取出心脏，将其在10％福尔马林中固定，然后切片用于马松三色染色以评估纤维化。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比增加的心肌纤维化。在心力衰竭的这种TAC模型中，BMP10pro(22-312)-Fc处理显著地降低了心肌纤维化。(*)和(#)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0064] 图21示出了编码人BMP10前体蛋白的核酸序列，被指定为SEQ ID NO:33。

[0065] 图22示出了编码人BMP10前肽结构域蛋白的核酸序列，被指定为SEQ ID NO:35。

[0066] 图23示出了在小鼠TAC模型中hENG(27-581)-mFc对心脏肥大的影响。比较来自假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-hENG(27-581)-mFc处理的动物的心脏重量与体重之比

(HW/BW;mg/g)。与假手术的动物相比,TAC-PBS对照动物显示出明显的心脏肥大。在心力衰竭的这种TAC模型中,hENG(27-581)-mFc处理抑制心脏肥大。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0067] 图24示出了在小鼠TAC模型中hENG(27-581)-mFc对短轴缩短率的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-hENG(26-5861)-mFc处理的动物中左心室舒张末期直径和左心室收缩末期直径。使用以下等式:FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]从舒张末期直径(EDD)和收缩末期直径(ESD)计算短轴缩短率(FS)。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比减小了约20％的短轴缩短率。在心力衰竭的这种TAC模型中,hENG(267-581)-mFc处理显著地增加了舒张期短轴缩短率。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0068] 图25示出了在小鼠TAC模型中hENG(27-581)-mFc对射血分数的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-hENG(27-581)-mFc处理的动物中舒张末期容积(EDD)和收缩末期容积(ESD)。使用以下等式:EF％＝(EDV-ESV)/EDV计算射血分数(EF)。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比减小的射血分数。在心力衰竭的这种TAC模型中,hENG(27-581)-mFc处理显著地增加了射血分数。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0069] 图26示出了在小鼠TAC模型中hENG(27-581)-mFc对心肌纤维化的影响。从假手术、TAC-PBS(媒介物对照)和TAC-hENG(27-581)-mFc处理的动物取出心脏,将其在10％福尔马林中固定,然后切片用于马松三色染色以评估纤维化。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比增加的心肌纤维化。在心力衰竭的这种TAC模型中,hENG(27-581)-mFc处理显著地降低了心肌纤维化。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0070] 图27示出了在小鼠MI模型中BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(26-5861)-mFc对心脏肥大的影响。比较来自MI-PBS(媒介物对照)、MI-BMP10pro(22-312)-Fc和TAC-hENG(27-581)-mFc处理的动物的心脏重量与体重之比(HW/BW;mg/g)。与假手术的动物相比,MI-PBS对照动物显示出明显的心脏肥大。在心力衰竭的这种MI模型中,hENG(27-581)-mFc或BMP10pro(22-312)-Fc处理抑制心脏肥大。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0071] 图28示出了在小鼠MI模型中BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc对收缩末期左心室扩张的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、MI-PBS(媒介物对照)、MI-hENG(27-581)-mFc和MI-BMP10pro(22-312)-Fc处理的动物中收缩末期的左心室扩张。MI-PBS小鼠显示出与假手术动物相比增加的左心室收缩末期直径(LVESD mm)。在心力衰竭的这种MI模型中,BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc处理显著地减小了左心室收缩末期直径。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0072] 图29示出了在小鼠MI模型中BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc对舒张末期左心室扩张的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、MI-PBS(媒介物对照)、MI-hENG(27-581)-mFc和MI-BM10Ppro(22-312)-Fc处理的动物中舒张末期的左心室扩张。MI-PBS小鼠显示出与假手术动物相比增加的左心室舒张末期直径(LVEDD mm)。在心力衰竭的这种MI模型中,BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc处理显著地减小了左心室舒张末期直径。(*)表示单向ANOVA,然后是Tukey。

[0073] 图30示出了在小鼠MI模型中BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc对心肌纤维化的影响。从MI-PBS(媒介物对照)、MI-BMP10pro(22-312)-Fc和MI-hENG(27-581)-mFc处理的动物取出心脏,将其在10％福尔马林中固定,然后切片用于马松三色染色以评估纤维

化。MI-PBS小鼠显示出与假手术动物相比增加的心肌纤维化。在心力衰竭的这种MI模型中，BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc处理显著地降低了心肌纤维化。(*)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0074] 图31示出了在小鼠MI模型中BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc对短轴缩短率的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、MI-PBS(媒介物对照)、MI-BMP10pro(22-312)-Fc或和MI-hENG(27-581)-mFc处理的动物中左心室舒张末期直径和左心室收缩末期直径。使用以下等式:FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]从舒张末期直径(EDD)和收缩末期直径(ESD)计算短轴缩短率(FS)。TAC-PBS小鼠显示出与假手术动物相比减小了约20％的短轴缩短率。在心力衰竭的这种MI模型中，hENG(27-581)-mFc处理显著地增加了舒张期短轴缩短率。(*)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

[0075] 图32示出了在小鼠MI模型中BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc对射血分数的影响。获得M模式超声心动图以测量假手术、MI-PBS(媒介物对照)、MI-BMP10pro(22-312)-Fc和MI-hENG(27-581)-mFc处理的动物中舒张末期容积(EDD)和收缩末期容积(ESD)。使用以下等式:EF％＝(EDV-ESV)/EDV计算射血分数(EF)。MI-PBS小鼠显示出与假手术动物相比减小的射血分数。在心力衰竭的这种MI模型中，hENG(27-581)-mFc处理显著地增加了射血分数。(*)表示单向ANOVA，然后是Tukey。

具体实施方式

[0076] 1.概述

[0077] TGFβ超家族包括超过30种分泌因子，包括TGFβ、激活素、nodal、骨形态发生蛋白(BMP)、生长分化因子(GDF)和抗苗勒管激素(AMH)[Weiss等人(2013)Developmental Biology,2(1):47-63]。在脊椎动物和无脊椎动物中均发现的所述超家族的成员在各种组织中普遍表达并在动物的一生中的发育的最早阶段过程中起作用。实际上，TGFβ超家族蛋白是干细胞自我更新、原肠胚形成、分化、器官形态发生和成年组织内稳态的关键介体。与这种遍在活性一致，异常TGFβ超家族信号传导与广泛范围的人类病理相关。

[0078] TGFβ超家族的配体共享相同的二聚体结构，其中一个单体的中心3-1/2转角螺旋抵靠另一单体的β链形成的凹面包装。大多数TGFβ家族成员通过分子间二硫键进一步稳定。这种二硫键横穿另外两个二硫键形成的环，产生被称为‘半胱氨酸结’的基序[Lin等人(2006)Reproduction 132:179-190;和Hinck等人(2012)FEBS Letters 586:1860-1870]。

[0079] TGFβ超家族信号传导是由I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合物介导，所述激酶受体在配体刺激后磷酸化并激活下游SMAD蛋白(例如，SMAD蛋白1、2、3、5和8)[Massagué(2000)Nat.Rev.Mol.Cell Biol.1:169-178]。这些I型和II型受体是跨膜蛋白，其由具有富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶特异性的细胞质结构域构成。一般而言，I型受体介导细胞内信号传导，而II型受体是结合TGF-β超家族配体所需的。I型和II型受体在配体结合后形成稳定的复合物，从而导致II型受体对I型受体的磷酸化。

[0080] TGFβ家族可以基于其所结合的I型受体和其所激活的Smad蛋白分为两个系统发育分支。一个分支是最近进化的分支，其包括例如TGFβ、激活素、GDF8、GDF9、GDF11、BMP3和nodal，它们通过激活Smad 2和Smad 3的I型受体传导信号[Hinck(2012)FEBS Letters

586:1860-1870]。另一个分支包含所述超家族的更远相关的蛋白质，并且包括例如BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF1、GDF5、GDF6和GDF7，它们通过Smad 1、5和8发送信号。

[0081] 激活素是TGFβ超家族的成员，并且最初是作为促卵泡激素的调节剂发现的，但是随后已经表征了多种生殖和非生殖作用。有三种主要的激活素形式(A、B和AB)，它们是两个密切相关的β亚基的同二聚体/异二聚体(分别为$\beta_A\beta_A$、$\beta_B\beta_B$和$\beta_A\beta_B$)。人类基因组还编码主要在肝脏中表达的激活素C和激活素E，并且含有β_C或β_E的异二聚体形式也是已知的。在TGF-β超家族中，激活素是独特的多功能因子，其可以刺激在卵巢和胎盘细胞中的激素产生，支持神经元细胞存活，根据细胞类型积极或消极地影响细胞周期进程，并且至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层分化[DePaolo等人(1991)Proc Soc Ep Biol Med.198:500-512;Dyson等人(1997)Curr Biol.7:81-84;和Woodruff(1998)Biochem Pharmacol.55:953-963]。在若干种组织中，激活素信号传导受到其相关异二聚体抑制素的拮抗。例如，在促卵泡激素(FSH)从垂体的分泌的调节中，激活素促进FSH合成和分泌，而抑制素减少FSH合成和分泌。可调节激活素生物活性和/或与激活素结合的其他蛋白质包括卵泡抑素(FS)、卵泡抑素相关蛋白(FSRP，也称为FLRG或FSTL3)和α_2-巨球蛋白。

[0082] BMP和GDF一起形成半胱氨酸结细胞因子的家族，所述细胞因子共享TGFβ超家族的特征性折叠[Rider等人(2010)Biochem J.,429(1):1-12]。此家族包括例如BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP2a、BMP3、BMP3b(也称为GDF10)、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8、BMP8a、BMP8b、BMP9(也称为GDF2)、BMP10、BMP11(也称为GDF11)、BMP12(也称为GDF7)、BMP13(也称为GDF6)、BMP14(也称为GDF5)、BMP15、GDF1、GDF3(也称为VGR2)、GDF8(也称为肌生成抑制蛋白)、GDF9、GDF15和生物皮肤生长因子(decapentaplegic)。除了诱导骨形成的能力(这赋予了BMP的名称)之外，BMP/GDF在广泛范围的组织的发育中展示出形态发生活性。BMP/GDF同二聚体和异二聚体与I型和II型受体二聚体的组合相互作用以产生多种可能的信号传导复合物，从而导致两组竞争的SMAD转录因子之一的激活。BMP/GDF具有高度特异性和局限性的功能。这些功能通过多种方式进行调节，包括BMP/GDF表达的发育限制和通过分泌以高亲和力结合细胞因子的几种特异性BMP拮抗剂蛋白。奇怪的是，许多这些拮抗剂类似于TGFβ超家族配体。

[0083] 如本文所证明的，与各种BMP蛋白(包括BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5)结合的可溶性BMP10pro多肽在横向主动脉缩窄(TAC)心力衰竭模型中有效地降低心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化的严重程度以及改善心脏功能。此外，在本研究中BMP10pro治疗增加了心力衰竭患者的存活时间。BMP10pro多肽在心肌梗塞(MI)心力衰竭模型中也具有类似的有益作用。此外，与BMP9和BMP10结合的可溶性内皮糖蛋白多肽显示出在TAC和MI心力衰竭模型中具有不同的有益作用。尽管不希望受任何特定机制的束缚，但预期BMP10pro多肽和内皮糖蛋白多肽的作用主要由BMP(特别是BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种)信号传导拮抗作用引起。无论机制如何，从本文呈现的数据可以明显看出，BMP信号传导拮抗剂确实降低了心脏肥大的严重程度，减少了心脏重塑，降低了心肌纤维化，并且具有治疗心力衰竭的其他积极作用。值得注意的是，血压、肥大、心脏重塑和纤维化是动态的，其变化取决于可增加血压、肥大、心脏重塑和纤维化的因素与能减小血压、肥大、心脏重塑和纤维化的因素的平衡。通过增加可降低血压、肥大、心脏重塑和纤维化的因子;减少可提升血压、肥

大、心脏重塑和纤维化的因子;或者同时通过这两种方式可以降低血压、肥大、心脏重塑和纤维化。减少(降低)血压、肥大、心脏重塑和纤维化的术语是指血压、肥大、心脏重塑和纤维化的可观察到的物理变化,并且对于发生变化的机制旨在是中性的。

[0084] 用于本文所述研究中的心脏动物模型被认为是对于在人类中的功效的预测,因此,本公开文本提供了使用BMP10pro多肽、内皮糖蛋白多肽和其他BMP拮抗剂治疗人类中的心力衰竭,特别是治疗、预防心力衰竭的一种或多种并发症或者降低心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度或持续时间的方法。如本文所公开的,术语BMP拮抗剂指可以用于拮抗BMP信号传导的多种药剂,包括例如抑制一种或多种BMP配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5]的拮抗剂;抑制一种或多种与BMP相互作用的I型、II型或共受体的拮抗剂(例如,ALK1、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和内皮糖蛋白);和抑制一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad蛋白如Smad 2和3)的拮抗剂。根据本公开文本的方法和用途使用的BMP拮抗剂包括多种形式,例如配体陷阱(例如,可溶性BMP10pro多肽、ActRIIA多肽、ActRIIB多肽、ALK1多肽和内皮糖蛋白多肽)、抗体拮抗剂(例如,抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ALK1、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和内皮糖蛋白中的一种或多种的抗体)、小分子拮抗剂[例如,抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ALK1、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、内皮糖蛋白和一种或多种Smad蛋白(例如,Smad 2和3)中的一种或多种的小分子]和核苷酸拮抗剂[例如,抑制BMP10、BMP9、BMP6、BMP3b、BMP5、ALK1、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、内皮糖蛋白和一种或多种Smad蛋白(例如,Smad 2和3)中的一种或多种的核苷酸序列]。

[0085] 本说明书中使用的术语在本公开文本的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中通常具有它们在本领域中的普通含义。某些术语在下文或本说明书的其他地方进行讨论,以向从业者提供关于描述本公开文本的组合物和方法以及如何制备和使用它们的额外指导。术语的任何使用的范围或含义将从使用它的特定上下文中变得清楚。

[0086] 所有语法形式和拼写变体的“同源的”是指具有“共同的进化起源”的两种蛋白质之间的关系,所述蛋白质包括来自相同生物物种中的超家族的蛋白质以及来自不同生物物种的同源蛋白质。此类蛋白质(及其编码核酸)具有如通过其序列相似性所反映的序列同源性,无论是就同一性百分比而言还是根据特定残基或基序和保守位置的存在。然而,在通常的用法中和在本申请中,术语“同源的”在用副词如“高度地”修饰时,可以指序列相似性,并且可以涉及或可以不涉及共同的进化起源。

[0087] 所有语法形式的术语“序列相似性”是指可以共享或可以不共享共同的进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应的程度。

[0088] 将关于参考多肽(或核苷酸)序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在用以实现最大百分比序列同一性并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)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。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对能以本领域技术范围内的多种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括为了在被比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。然而,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸(核酸)序列同一性值%。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.编写,并且源代码已经以用户文档提交在美国版权局

(U.S.Copyright Office),华盛顿,20559中,其中它在美国版权登记号TXU510087下注册。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech,Inc.公开获得,或者可以从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且不变。

[0089] 所有语法形式的"激动"是指激活蛋白质和/或基因(例如,通过激活或扩增该蛋白质的基因表达或通过诱导无活性蛋白质进入活性状态)或提高蛋白质和/或基因的活性的过程。

[0090] 所有语法形式的"拮抗"是指抑制蛋白质和/或基因(例如,通过抑制或减少该蛋白质的基因表达或通过诱导活性蛋白质进入无活性状态)或降低蛋白质和/或基因的活性的过程。

[0091] 在整个说明书和权利要求书中结合数值使用的术语"约"和"大约"表示本领域技术人员熟悉和可接受的精确度区间。一般而言,这种精确度区间为±10%。可替代地并且特别地,在生物系统中,术语"约"和"大约"可以意指在给定值的数量级内(优选≤5倍且更优选≤2倍)的值。

[0092] 本文公开的数字范围包含限定所述范围的数字。

[0093] 术语"一个"和"一种"包括复数指代物,除非使用该术语的上下文另有明确规定。术语"一个"(或"一种")以及术语"一个/一种或多个/多种"在本文中可以互换使用。此外,本文使用的"和/或"被视为两个或更多个指定特征或组分中的每一个与或不与其他特征或组分的特定公开。因此,如在本文中以短语如"A和/或B"使用的术语"和/或"旨在包括"A和B"、"A或B"、"A"(单独)和"B"(单独)。同样地,如以短语如"A、B和/或C"使用的术语"和/或"旨在涵盖以下方面中的每一个: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);以及C(单独)。

[0094] 2.BMP10前肽、ActRII多肽、ALK1多肽、BMPRII多肽和内皮糖蛋白多肽

[0095] 在某些方面,本公开文本涉及BMP10前肽(BMP10pro)多肽及其用途(例如,治疗心力衰竭或心力衰竭的并发症)。如本文所用,术语"BMP10多肽"是指源自任何物种的10型骨形态发生蛋白的家族。术语"BMP10多肽"包括任何天然存在的BMP10多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。天然存在的BMP10蛋白通常被编码为较大的前体,其通常在其N末端含有信号序列,接着是二元氨基酸切割位点和前肽,接着是另一个二元氨基酸切割位点和成熟结构域。人BMP10前体序列(NCBI NP_055297)如下所示:

1 MGSLVLTLCA LFCLAAYLVS GSPIMNLEQS PLEEDMSLFG DVFSEQDGVD

51 FNTLLQSMKD EFLKTLNLSD IPTQDSAKVD PPEYMLELYN KFATDRTSMP

101 SANIIRSFKN EDLFSQPVSF NGLRKYPLLF NVSIPHHEEV IMAELRLYTL

151 VQRDRMIYDG VDRKITIFEV LESKGDNEGE RNMLVLVSGE IYGTNSEWET

[0096] 201 FDVTDAIRRW QKSGSSTHQL EVHIESKHDE AEDASSGRLE IDTSAQNKHN

251 PLLIVFSDDQ SSDKERKEEL NEMISHEQLP ELDNLGLDSF SSGPGEEALL

301 QMRSNIIYDS TARIRRNAKG NYCKRTPLYI DFKEIGWDSW IIAPPGYEAY

351 ECRGVCNYPL AEHLTPTKHA IIQALVHLKN SQKASKACCV PTKLEPISIL

401 YLDKGVVTYK FKYEGMAVSE CGCR (SEQ ID NO: 32)

[0097] 信号肽(氨基酸1-21)是加下划线的;成熟蛋白(氨基酸317-424)是加双下划线的;并且潜在的N-连接糖基化位点是加框线的。图21示出编码SEQID NO:32的BMP10前体蛋白的核酸序列(此核酸被指定为SEQ ID NO:33)。

[0098] 术语“BMP10前肽”或“BMP10pro”用于指包含BMP10家族成员的任何天然存在的前肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)的多肽。BMP10pro多肽的有用活性的例子包括与BMP10蛋白的成熟部分结合并充当成熟BMP10的活性的拮抗剂。如本文所证明的,BMP10pro多肽还可以与BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种结合。因此,在一些实施方案中,BMP10pro多肽还可以用作BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种的拮抗剂。BMP10前肽的功能变体的特征可以在于例如与成熟BMP10蛋白结合和/或竞争性地抑制BMP10与II型受体(如ActRIIA、ActRIIB、BMPRII)、I型受体(如ALK1)、和/或共受体(如内皮糖蛋白)的结合的能力。

[0099] 人BMP10前肽序列如下所示:

GSPIMNLEQS PLEEDMSLFG DVFSEQDGVD

FNTLLQSMKD EFLKTLNLSD IPTQDSAKVD PPEYMLELYN KFATDRTSMP

SANIIRSFKN EDLFSQPVSF NGLRKYPLLF NVSIPHHEEV IMAELRLYTL

[0100] VQRDRMIYDG VDRKITIFEV LESKGDNEGE RNMLVLVSGE IYGTNSEWET

FDVTDAIRRW QKSGSSTHQL EVHIESKHDE AEDASSGRLE IDTSAQNKHN

PLLIVFSDDQ SSDKERKEEL NEMISHEQLP ELDNLGLDSF SSGPGEEALL

QMRSNIIYDS TARIRR (SEQ ID NO: 34)

[0101] 图22示出了编码对应于SEQ ID NO:34的BMP10前肽的核酸序列(此核酸被指定为SEQ ID NO:35)。

[0102] BMP10前肽在脊椎动物中是保守的。因此,可以使用本领域公知的和如本文所述的技术生成来自不同脊椎动物的BMP10前肽序列的比对,并使用这些比对来预测在前肽结构域内对于成熟BMP10结合活性而言重要的关键氨基酸位置,以及预测可能耐受取代而不显著地改变成熟BMP10结合活性的氨基酸位置。因此,根据本发明公开的方法有用的活性人

BMP10pro变体多肽可以包含在来自另一种脊椎动物BMP10pro多肽的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸,或者可以包含类似于人或其他脊椎动物序列中的残基的残基。

[0103] 如本文所示,包含具有前肽序列的C末端精氨酸的缺失(在SEQ ID NO:34的位置296处的氨基酸的缺失)的BMP10pro结构域的变体BMP10pro多肽保留对于BMP10的高亲和力,并且可以用作BMP10拮抗剂。生成了另一种变体BMP10pro多肽,其包含在前肽序列的C末端具有四个氨基酸的缺失(在SEQ ID NO:34的位置293-296处的氨基酸的缺失)的BMP10pro结构域。出人意料的是,从前肽序列的C末端缺失四个氨基酸的变体BMP10pro多肽是比仅具有C末端精氨酸缺失的BMP10pro多肽更有效的BMP10活性拮抗剂。因此,在关于SEQ ID NO:34的氨基酸292、293、294、295和296中的任何一个处停止的BMP10pro多肽结构域预期全部都是活性的,但在292处停止的构建体可能是最具活性的。根据临床或实验设置,可能需要使用这些形式中的任何一种。

[0104] BMP10pro多肽可以另外包括N末端处的多种前导序列中的任何一种。这个序列将允许在真核系统中表达所述肽并使其靶向分泌途径。参见例如,Ernst等人,美国专利号5,082,783(1992)。可替代地,可以使用天然BMP10信号序列来实现从细胞挤出。可能的前导序列包括在本文中公开的蜜蜂峰毒肽、TPA和天然前导序列。掺入TPA前导序列的BMP10pro-Fc融合蛋白的例子包括SEQ ID NO:82和85。信号肽的加工可能根据所选择的前导序列、所用的细胞类型和培养条件以及其他变量而变化,因此成熟BMP10pro多肽的实际N末端起始位点可能会在N末端方向移位1、2、3、4或5个氨基酸。因此,在BMP10pro的N末端处,预期从关于SEQ ID NO:34的氨基酸1、2、3、4、5或6中的任何一个开始的蛋白质预期全部都是活性的。

[0105] 总之,BMP10pro的活性部分(例如,成熟BMP10结合部分)的通式包含SEQ ID NO:34的氨基酸6-292。因此,BMP10pro多肽可以例如包含与BMP10pro的一部分至少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,基本上由所述氨基酸序列组成,或由所述氨基酸序列组成,所述BMP10pro的一部分从对应于SEQ ID NO:34的氨基酸1-6中的任何一个的残基处开始(例如,从氨基酸1、2、3、4、5或6中的任何一个处开始),并且在对应于SEQ ID NO:34的氨基酸292-296中的任何一个的位置处结束(例如,在氨基酸292、293、294、295或296中的任何一个处结束)。例如,在一些实施方案中,本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-296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,由所述氨基酸序列组成,或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-295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,由所述氨基酸序列组成,或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-294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,由所述氨基酸序列组成,或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-293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,由所述氨基酸序列组成,或基本上由所述氨基酸序列组

成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸1-292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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸2-295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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸2-292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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸3-295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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸3-294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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸3-292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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸4-292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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸5-292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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的BMP10pro多肽可以包含与SEQ ID NO:34的氨基酸6-292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，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。优选地，BMP10pro多肽是可溶性的。预期上述BMP10pro多肽将保留成熟BMP10结合和拮抗活性。在一些实施方案中，此类BMP10pro多肽还可以与BMP9、BMP6、BMP3b和BMP5中的一种或多种结合。

[0106] 在某些方面，本公开文本涉及ActRII多肽及其用途(例如，治疗心力衰竭或心力衰竭的并发症)。如本文所用，术语“ActRII”是指II型激活素受体的家族。这个家族包括激活素受体IIA型(ActRIIA)和激活素受体IIB型(ActRIIB)。

[0107] 如本文所用，术语“ActRIIB”是指来自任何物种的激活素受体IIB型(ActRIIB)蛋白质的家族以及通过诱变或其他修饰来源于此类ActRIIB蛋白的变体。本文中对ActRIIB的提及应理解为对任何一种当前鉴定的形式的提及。ActRIIB家族的成员通常是跨膜蛋白，其由包含富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、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构成。

[0108] 术语“ActRIIB多肽”包括如下多肽，所述多肽包含ActRIIB家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。此类变体ActRIIB多肽的例子在整个本公开文本以及通过引用以其整体并入本文的国际专利申请公开号WO 2006/012627、WO2008/097541和WO 2010/151426中提供。本文所述的所有ActRIIB相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人ActRIIB前体蛋白序列(SEQ ID NO:1)的编号，除非另外特别指出。

[0109] 人ActRIIB前体蛋白序列如下：

```
  1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
 51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
```

[0110]

```
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1)
```

[0111] 信号肽用单下划线表示；细胞外结构域用粗体字表示；并且潜在的内源性N-连接糖基化位点用双下划线表示。

[0112] 加工的细胞外ActRIIB多肽序列如下：

[0113] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDF NCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT(SEQ ID NO:2)。

[0114] 在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“SGR……”序列的蛋白质。细胞外结构域的C末端“尾部”用单下划线表示。缺失“尾部”的序列(Δ15序列)如下：

[0115] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA(SEQ ID NO:3)。

[0116] 文献中还报道了在SEQ ID NO:1的位置64处具有丙氨酸(A64)的ActRIIB的形式。参见例如，Hilden等人(1994)Blood，83(8):2163-2170。已经确定，包含具有A64取代的ActRIIB的细胞外结构域的ActRIIB-Fc融合蛋白对激活素和GDF11具有相对较低的亲和力。相比之下，具有在位置64处的精氨酸(R64)的相同ActRIIB-Fc融合蛋白对激活素和GDF11具有在低纳摩尔至高皮摩尔范围内的亲和力。因此，具有R64的序列用作本公开文本中人ActRIIB的“野生型”参考序列。

[0117] 具有在位置64处的丙氨酸的ActRIIB的形式如下：

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE

51 GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY

101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS

151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR

201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA

[0118] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY

301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK

351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC

401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL

451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV

501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 4)

[0119] 信号肽用单下划线表示，并且细胞外结构域用粗体字表示。

[0120] 替代A64形式的加工的细胞外ActRIIB多肽序列如下：

[0121] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT(SEQ ID NO:5)

[0122] 在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“SGR……”序列的蛋白质。细胞外结构域的C末端“尾部”用单下划线表示。缺失“尾部”的序列(Δ15序列)如下：

[0123] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA(SEQ ID NO:6)

[0124] 编码人ActRIIB前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:7)，表示Genbank参考序列NM_001106.3的核苷酸25-1560，其编码ActRIIB前体的氨基酸1-513。如所示的序列提供了位置64处的精氨酸，并且可以被修饰为替代地提供丙氨酸。信号序列是加下划线的。

[0125]

```
   1  ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
  51  CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
 101  CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
 151  GGCGAGCAGG 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 CCTCTCATAC
 901  CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
 951  TGCCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
1001  CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
1051  CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
1101  TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA 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  TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
1451  CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
1501  ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)
```

[0126]

[0127] 编码加工的细胞外人ActRIIB多肽的核酸序列如下(SEQ ID NO:8)。如所示的序列提供了位置64处的精氨酸,并且可以被修饰为替代地提供丙氨酸。

[0128]

```
   1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACTG
  51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC
 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT
 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
 301 GGGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
```

(SEQ ID NO: 8)

[0129] 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示于图1中。此比对显示了被认为直接接触ActRII配体的两种受体内的氨基酸残基。例如，复合ActRII结构显示ActRIIB-配体结合口袋部分地由残基Y31、N33、N35、L38至T41、E47、E50、Q53至K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78至N83、Y85、R87、A92以及E94至F101定义。在这些位置处，预期保守突变将会是耐受的。

[0130] 另外，ActRIIB在脊椎动物中是良好保守的，其中大段的细胞外结构域完全保守。例如，图2描绘了与多种ActRIIB直系同源物相比的人ActRIIB细胞外结构域的多序列比对。与ActRIIB结合的许多配体也是高度保守的。因此，根据这些比对，可以预测配体结合结构域内对于正常的ActRIIB-配体结合活性重要的关键氨基酸位置，并且预测可能耐受取代而不显著改变正常的ActRIIB-配体结合活性的氨基酸位置。因此，根据本发明公开的方法有用的活性人ActRIIB变体多肽可以包含在来自另一种脊椎动物ActRIIB的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸，或者可以包含类似于人或其他脊椎动物序列中的残基的残基。不意在是限制性的，以下例子说明了定义活性ActRIIB变体的这种方法。人细胞外结构域(SEQ ID NO:103)中的L46是爪蟾(Xenopus)ActRIIB(SEQ ID NO:105)中的缬氨酸，并且因此这个位置可以改变，并且任选地可以改变为另一种疏水性残基(如V、I或F)或非极性残基(如A)。人细胞外结构域中的E52是爪蟾中的K，指示这个位点可以耐受众多的变化，包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能地A。人细胞外结构域中的T93是爪蟾中的K，指示在这个位置耐受宽结构变异，且偏好极性残基，如S、K、R、E、D、H、G、P、G和Y。人细胞外结构域中的F108是爪蟾中的Y，并且因此应耐受Y或其他疏水性基团，如I、V或L。人细胞外结构域中的E111是爪蟾中的K，指示在这个位置将耐受带电荷的残基(包括D、R、K和H)以及Q和N。人细胞外结构域中的R112是爪蟾中的K，指示在这个位置耐受碱性残基，包括R和H。在人细胞外结构域中的位置119处的A相对较不保守，并且在啮齿类动物中作为P出现且在爪蟾中作为V出现，由此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0131] 此外，本领域中已经在结构和功能特征方面、特别是关于配体结合表征了ActRII蛋白[Attisano等人(1992)Cell 68(1):97-108;Greenwald等人(1999)Nature Structural Biology 6(1):18-22;Allendorph等人(2006)PNAS 103(20:7643-7648;Thompson等人(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]。除了本文的传授之外，这些参考文献充分地提供了关于如何产生保留一种或多种正常活性(例如，配体结合活性)的ActRIIB变体的指导。

[0132] 例如,称为三指毒素折叠的定义性结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的,并且是由位于每种单体受体的细胞外结构域内不同位置处的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;和Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此,如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ActRIIB的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:1(ActRIIB前体)的位置29-109。侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较不有序的氨基酸可以在N末端被截短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或28个残基,和/或在C末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基,而不必改变配体结合。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 NO:2、3、5和6。

[0133] Attisano等人表明ActRIIB的细胞外结构域的C末端的脯氨酸结的缺失降低了受体对激活素的亲和力。含有本发明SEQ ID NO:1的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合蛋白"ActRIIB(20-119)-Fc"相对于ActRIIB(20-134)-Fc具有降低的与GDF11和激活素的结合,所述ActRIIB(20-134)-Fc包含脯氨酸结区域和完整的近膜结构域(参见例如美国专利号7,842,663)。然而,ActRIIB(20-129)-Fc蛋白相对于野生型保留类似但略微降低的活性,即使脯氨酸结区域被破坏。

[0134] 因此,在氨基酸134、133、132、131、130和129(关于SEQ ID NO:1)处停止的ActRIIB细胞外结构域预期全部都具活性,但在134或133处停止的构建体可能是最具活性的。类似地,预期在残基129-134(关于SEQ ID NO:1)中任何一个处的突变不会大幅改变配体结合亲和力。支持这一点的是,本领域已知,P129和P130(关于SEQ ID NO:1)的突变基本上不降低配体结合。因此,本公开文本的ActRIIB多肽可以早在氨基酸109(最终半胱氨酸)处结束,然而,预期在109和119处或在109与119之间(例如,109、110、111、112、113、114、115、116、117、118或119)结束的形式具有降低的配体结合。氨基酸119(关于本发明SEQ ID NO:1)保守性差,并且因此容易改变或截短。在128(关于SEQ ID NO:1)处或稍后结束的ActRIIB多肽和基于ActRIIB的GDF阱应保留配体结合活性。关于SEQ ID NO:1在119和127处或在119与127之间(例如,119、120、121、122、123、124、125、126或127)结束的ActRIIB多肽和基于ActRIIB的GDF阱将具有中等结合活性。根据临床或实验设置,可能需要使用这些形式中的任何一种。

[0135] 在ActRIIB的N末端,预期以氨基酸29(关于SEQ ID NO:1)或之前开始的蛋白质将保留配体结合活性。氨基酸29表示初始半胱氨酸。在位置24(关于SEQ ID NO:1)处的丙氨酸到天冬酰胺突变引入N-连接糖基化序列而基本上不影响配体结合[美国专利号7,842,663]。这证实了在信号切割肽与半胱氨酸交联区域之间的对应于氨基酸20-29的区域中的突变是良好耐受的。具体地,以位置20、21、22、23和24(关于SEQ ID NO:1)开始的ActRIIB多肽应保留一般的配体结合活性,并且还预期以位置25、26、27、28和29(关于SEQ ID NO:1)开始的ActRIIB多肽保留配体结合活性。例如美国专利号7,842,663已经证明以22、23、24或25开始的ActRIIB构建体惊人地具有最大活性。

[0136] 总之,ActRIIB的活性部分(例如,配体结合部分)的通式包含SEQ ID NO:1的氨基酸29-109。因此,ActRIIB多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29中任一个的残基处开始(例如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109-134中任一个的位置处结束(例如,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中的任一个处结束)的ActRIIB的一部分至少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,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。其他例子包括如下多肽,所述多肽以来自SEQ ID NO:1的20-29(例如,位置20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任何一个)或21-29(例如,位置21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任何一个)的位置开始,并且以来自SEQ ID NO:1的119-134(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任何一个)、119-133(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133中的任何一个)、129-134(例如,位置129、130、131、132、133或134中的任何一个)或129-133(例如,位置129、130、131、132或133中的任何一个)的位置结束。其他例子包括如下构建体,所述构建体以来自SEQ ID NO:1的20-24(例如,位置20、21、22、23或24中的任何一个)、21-24(例如,位置21、22、23或24中的任何一个)或22-25(例如,位置22、22、23或25中的任何一个)的位置开始,并且以来自SEQ ID NO:1的109-134(例如,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134中的任何一个)、119-134(例如,位置119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133或134中的任何一个)或129-134(例如,位置129、130、131、132、133或134中的任何一个)的位置结束。还考虑了这些范围内的变体,特别是包含与SEQ ID NO:1的相应部分具有至少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、基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成的那些。

[0137] 本文描述的变异能以各种方式组合。在一些实施方案中,ActRIIB变体包含配体结合口袋中的不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守氨基酸变化,任选地在配体结合口袋中的位置40、53、55、74、79和/或82的零个、一个或多个非保守改变。结合口袋外部的位点(在此处可变性可以特别地良好耐受)包括细胞外结构域的氨基和羧基末端(如上所述)以及位置42-46和65-73(关于SEQ ID NO:1)。在位置65处的天冬酰胺至丙氨酸的改变(N65A)似乎不降低R64背景中的配体结合[美国专利号7,842,663]。这种变化可能消除A64背景中N65处的糖基化,因此证明,这个区域中的显著变化可能耐受。虽然R64A变化的耐受性差,但R64K是良好耐受的,因此另一种碱性残基如H可以在位置64处耐受[美国专利号7,842,663]。另外,本领域描述的诱变程序的结果表明ActRIIB中存在通常有益于保守的氨基酸位置。关于SEQ ID NO:1,这些位置包括位置80(酸性或疏水性氨基酸)、位置78(疏水性氨基酸,并且特别是色氨酸)、位置37(酸性氨基酸,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,本公开文本提供了可在ActRIIB多肽中保守的氨基酸的框架。可能需要保守的其他位置如下:位置52(酸性氨基酸)、位置55(碱性氨基酸)、位置81(酸性氨基酸)、98(极性或带电的氨基酸,特别是E、D、R或K),所有这些位置都是关于SEQ ID NO:1。

[0138] 先前已经证明,将另一N-连接糖基化位点(N-X-S/T)添加至ActRIIB细胞外结构域中是良好耐受的(参见例如,美国专利号7,842,663)。因此,N-X-S/T序列通常可以在本公开文本的ActRIIB多肽中例如图1中定义的配体结合口袋外部的位置处引入。用于引入非内源N-X-S/T序列的特别合适的位点包括氨基酸20-29、20-24、22-25、109-134、120-134或129-

134(关于SEQID NO:1)。还可以将N-X-S/T序列引入ActRIIB序列与Fc结构域或其他融合组分之间的接头中,以及任选地引入融合组分本身中。可以通过关于预先存在的S或T在正确位置处引入N,或者通过在对应于预先存在的N的位置处引入S或T,毫不费力地引入这个位点。因此,产生N-连接糖基化位点的期望的改变是:A24N、R64N、S67N(可能与N65A改变组合)、E105N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S和R112T(关于SEQ ID NO:1)。由于糖基化提供的保护作用,预测为糖基化的任何S可以改变为T而不产生免疫原性位点。同样,预测被糖基化的任何T可以改变为S。因此,考虑了改变S67T和S44T(关于SEQ ID NO:1)。同样,在A24N变体中,可以使用S26T改变。因此,本公开文本的ActRIIB多肽可以是具有一个或多个如上所述的其他非内源N-连接糖基化共有序列的变体。

[0139] 在某些实施方案中,本公开文本涉及ActRIIB多肽(包括其片段、功能变体和修饰形式)以及其用途(例如,治疗心力衰竭或心力衰竭的并发症)。优选地,ActRIIB多肽是可溶的(例如,ActRIIB的细胞外结构域)。在一些实施方案中,ActRIIB多肽拮抗一种或多种TGF-β超家族配体[例如,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(例如,Smad信号传导)。因此,在一些实施方案中,ActRIIB多肽与一种或多种TGF-β超家族配体[例如,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]结合。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸20-29的残基处开始(例如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27、28或29中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:1的氨基酸109-134的位置处结束(例如,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中的任一个处结束)的ActRIIB的一部分至少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,基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109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,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸29-109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,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成,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或人工酸性氨基酸)。在某些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131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,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在某些实施方案中,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸25-131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,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成,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,本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、123、131、132和133中的任何一个的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本公开文本的ActRIIB多肽包含与SEQ IDNO:1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、123、131、132和133中的任何一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由所述氨基酸序列组成，或基本上由所述氨基酸序列组成，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，本公开文本的ActRIIB多肽包含至少一种ActRIIB多肽，由其组成或基本上由其组成，其中对应于SEQ ID NO:1的L79的位置不是酸性氨基酸(即，不是天然存在的酸性氨基酸D或E或人工酸性氨基酸残基)。

[0140] 在某些实施方案中，本公开文本涉及ActRIIA多肽。如本文所用，术语“ActRIIA”是指来自任何物种的激活素受体IIA型(ActRIIA)蛋白家族和通过诱变或其他修饰源自此类ActRIIA蛋白的变体。本文中对ActRIIA的提及应理解为对当前鉴定的形式中的任一种的提及。ActRIIA家族的成员通常是由包含富含半胱氨酸的区的配体结合细胞外结构域、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组成的跨膜蛋白。

[0141] 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其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合体和肽模拟物形式)的多肽。此类变体ActRIIA多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号WO 2006/012627和WO 2007/062188中，将所述专利申请通过引用以其整体并入本文。本文所述的所有ActRIIA相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人ActRIIA前体蛋白序列(SEQ ID NO:9)的编号，除非另外特别指出。

[0142] 人ActRIIA前体蛋白序列是如下：

```
  1 MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC
 51 YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV
101 YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI
151 AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVKAR
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
```

[0143]

```
251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
401 CTAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG
451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM
501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 9)
```

[0144] 信号肽由单下划线表示；细胞外结构域以粗体字体表示；并且潜在内源性N-连接的糖基化位点由双下划线表示。

[0145] 经加工的细胞外人ActRIIA多肽序列如下：

[0146] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR

TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP(SEQ ID NO:10)

[0147] 细胞外结构域的C末端“尾部”用单下划线表示。缺失“尾部”的序列(Δ15序列)如下：

[0148] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM(SEQ ID NO:11)

[0149] 编码人ActRIIA前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:12)，如下Genbank参考序列NM_001616.4的核苷酸159-1700。信号序列加下划线。

```
   1  ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GGCGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTC
  51  TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA
 101  ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACTGGTGT TGAACCGTGT
 151  TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
 201  TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
 251  ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
 301  TATTTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT
 351  TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC
 401  CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT
 451  GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC
 501  CTACCCTCCT GTACTTGTTC CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCACCTT
 551  CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG
 601  GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC
 651  TGTCAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG
 701  AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT
 751  GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC
 801  AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG
 851  TCTCTTGGAA TGAACTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG
 901  GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC
 951  CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAAACAACC
1001  TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT TGAGGCTGGC
1051  AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC
1101  TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTTGA
1151  GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT GGCTTCTCGC
1201  TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA
1251  GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTTGTGC
1301  ATAAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA
1351  ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA
1401  AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA
1451  GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTCACAATG
1501  GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO: 12)
```

[0150]

[0151]

[0152] 编码经加工的人ActRIIA多肽的核酸序列如下：

[0153]

```
   1   ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA ATGCTAATTG
  51   GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA
 101   AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC
 151   ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA
 201   CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTTGTT
 251   GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG
 301   GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC(SEQ ID
NO:13)
```

[0154] ActRIIA在脊椎动物中是良好保守的,其中大段的细胞外结构域完全保守。例如,图3描绘了与多种ActRIIA直系同源物相比的人ActRIIA细胞外结构域的多序列比对。结合至ActRIIA的许多配体也是高度保守的。因此,根据这些比对,可以预测配体结合结构域内对于正常的ActRIIA-配体结合活性重要的关键氨基酸位置,并且预测可能耐受取代而不显著改变正常的ActRIIA-配体结合活性的氨基酸位置。因此,根据本发明公开的方法有用的活性人ActRIIA变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ActRIIA的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸,或者可以包括类似于人或其他脊椎动物序列中的残基的残基。

[0155] 不意在是限制性的,以下例子说明了定义活性ActRIIA变体的这种方法。如图3中所示,人细胞外结构域中的F13是绵羊(Ovis aries)(SEQ ID NO:108)、原鸡(Gallus gallus)(SEQ ID NO:111)、牛(Bos Taurus)(SEQ ID NO:112)、仓鸮(Tyto alba)(SEQ ID NO:113)和小鼠耳蝠(Myotis davidii)(SEQ ID NO:114)ActRIIA中的Y,指示在这个位置耐受芳香族残基,包括F、W和Y。人细胞外结构域中的Q24是牛ActRIIA中的R,指示在这个位置将耐受带电荷的残基,包括D、R、K、H和E。人细胞外结构域中的S95是原鸡和仓鸮ActRIIA中的F,指示这个位点可以耐受众多的变化,包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能地疏水性残基(如L、I或F)。人细胞外结构域中的E52是绵羊ActRIIA中的D,指示在这个位置耐受酸性残基,包括D和E。人细胞外结构域中的P29相对较不保守,在绵羊ActRIIA中作为S出现且在小鼠耳蝠ActRIIA中作为L出现,因此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0156] 此外,如上文所讨论,本领域中已经在结构/功能特征方面、特别是关于配体结合表征了ActRII蛋白[Attisano等人(1992)Cell 68(1):97-108;Greenwald等人(1999)Nature Structural Biology 6(1):18-22;Allendorph等人(2006)PNAS 103(20:7643-7648;Thompson等人(2003)The EMBO Journal22(7):1555-1566;以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的教导之外,这些参考文献充分地提供了关于如何产生保留一种或多种所需活性(例如,配体结合活性)的ActRIIA变体的指导。

[0157] 例如,称为三指毒素折叠的定义性结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的,并且是由位于每种单体受体的细胞外结构域内不同位置处的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;和Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此,如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ActRIIA的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:9(ActRIIA前体)的位置30-110。因此,侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较不有序的氨基酸可以在N末端被截短约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,并且在C末端被截短约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，而不必改变配体结合。示例性ActRIIA细胞外结构域截短物包括SEQ ID NO:10和11。

[0158] 因此，ActRIIA的活性部分(例如，配体结合部分)的通式是包含SEQ ID NO:9的氨基酸30-110、基本上由其组成或由其组成的多肽。因此，ActRIIA多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸21-30中任一个的残基处开始(例如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸110-135中任一个的位置处结束(例如，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中的任一个处结束)的ActRIIA的一部分至少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，基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。其他例子包括如下构建体，所述构建体在选自以下的位置处开始：SEQ ID NO:9的21-30(例如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、22-30(例如，在氨基酸22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、23-30(例如，在氨基酸23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、24-30(例如，在氨基酸24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)，并且在选自以下的位置处结束：SEQ ID NO:9的111-135(例如，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中的任一个处结束)、112-135(例如，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中的任一个处结束)、113-135(例如，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中的任一个处结束)、120-135(例如，在氨基酸120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、130-135(例如，在氨基酸130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、111-134(例如，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中的任一个处结束)、111-133(例如，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中的任一个处结束)、111-132(例如，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中的任一个处结束)或111-131(例如，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中的任一个处结束)。还考虑了这些范围内的变体，特别是包含与SEQ ID NO:9的相应部分具有至少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、基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成的那些。因此，在一些实施方案中，ActRIIA多肽可以包含与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，基本上由所述多肽组成或由所述多肽组成。任选地，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，并且包含配体结合口袋中的不超过1、2、5、10或15个保守氨基酸变化的多肽。

[0159] 在某些实施方案中，本公开文本涉及ActRIIA多肽以及其用途(例如，增加有需要的患者中的免疫应答和治疗癌症)，所述ActRIIA多肽包括其片段、功能变体和修饰形式。优选地，ActRIIA多肽是可溶的(例如，ActRIIA的细胞外结构域)。在一些实施方案中，ActRIIA多肽抑制一种或多种TGF-β超家族配体[例如，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(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ActRIIA多肽与一种或多种TGF-β超家族配体[例如，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]结合。在一些实施方案中，本公开文本的ActRIIA多肽包含与在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸21-30的残基处开始(例如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:9的氨基酸110-135中任一个的位置处结束(例如，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中的任一个处结束)的ActRIIA的一部分至少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，基本上由所述氨基酸序列组成或由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，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％相同的氨基酸序列，由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在某些实施方案中，ActRIIA多肽包含与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，由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:9、10、11、50、54和57中的任一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。

[0160] 在某些方面中，本公开文本涉及GDF阱多肽(也称为“GDF阱”)。在一些实施方案中，本公开文本的GDF阱是变体ActRII多肽(例如，ActRIIA和ActRIIB多肽)，其在ActRII多肽(例如，“野生型”或未经修饰的ActRII多肽)的细胞外结构域(也称为配体结合结构域)中包含一个或多个突变(例如，氨基酸添加、缺失、取代及其组合)，使得变体ActRII多肽与相应的野生型ActRII多肽相比具有一种或多种经改变的配体结合活性。在优选实施方案中，本公开文本的GDF阱多肽保留至少一种与相应的野生型ActRII多肽类似的活性。例如，优选的GDF阱结合至并抑制(例如，拮抗)GDF11和/或GDF8的功能。在一些实施方案中，本公开文本的GDF陷阱还结合并抑制TGF-β超家族的一种或多种配体。因此，本公开文本提供了GDF阱多肽，其对一种或多种ActRII配体具有改变的结合特异性。

[0161] 为了说明，可以选择一个或多个突变，所述突变提高经改变的配体结合结构域相对于一种或多种ActRII结合配体对GDF11和/或GDF8的选择性，所述ActRII结合配体是如激活素(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。任选地，经改变的配体结合结构域具有的激活素结合的K_d与GDF11和/或GDF8结合的K_d的比率相对于野生型配体结合结构域的所述比率高至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。任选地，经改变的配体结合结构域具有的抑制激活素的IC_{50}与抑制GDF11和/或GDF8的IC_{50}的比率相对于野生型配体结合结构域高至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。任

选地，经改变的配体结合结构域抑制GDF11和/或GDF8的IC_{50}比抑制激活素的IC_{50}低至少2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或甚至1000倍。

[0162] 在某些优选实施方案中，本公开文本的GDF阱被设计为优先结合至GDF11和/或GDF8(也称为肌生成抑制蛋白)。任选地，GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至激活素B。任选地，GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至BMP6。任选地，GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至BMP10。任选地，GDF11和/或GDF8结合阱可以进一步结合至激活素B和BMP6。在某些实施方案中，例如与野生型ActRII多肽相比，本公开文本的GDF阱对激活素(例如，激活素A、激活素A/B、激活素B、激活素C、激活素E)具有降低的结合亲和力。在某些优选实施方案中，本公开文本的GDF阱多肽对激活素A具有降低的结合亲和力。

[0163] ActRIIB蛋白的氨基酸残基(例如，关于SEQ ID NO:1的E39、K55、Y60、K74、W78、L79、D80和F101)位于ActRIIB配体结合口袋中并且帮助介导与其配体(包括例如激活素A、GDF11和GDF8)的结合。因此，本公开文本提供了GDF阱多肽，其包含ActRIIB受体的经改变的配体结合结构域(例如，GDF8/GDF11结合结构域)，所述配体结合结构域包含在那些氨基酸残基处的一个或多个突变。

[0164] 作为具体例子，ActRIIB的配体结合结构域的带正电荷的氨基酸残基Asp(D80)可以突变为不同的氨基酸残基，以产生优先结合至GDF8而不是激活素的GDF阱多肽。优选地，关于SEQ ID NO:1的D80残基变为选自以下的氨基酸残基：不带电荷的氨基酸残基、负氨基酸残基和疏水性氨基酸残基。作为另一具体例子，SEQ ID NO:1的疏水性残基L79可以发生改变以赋予改变的激活素-GDF11/GDF8结合特性。例如，L79P取代降低GDF11结合的程度大于激活素结合。相比之下，用酸性氨基酸置换L79[天冬氨酸或谷氨酸；L79D或L79E取代]在保留GDF11结合亲和力的同时大大降低激活素A结合亲和力。在示例性实施方案中，本文所述的方法利用GDF阱多肽，所述GDF阱多肽是变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:1的位置79的位置处的酸性氨基酸(例如，D或E)，任选地与一个或多个其他氨基酸取代、添加或缺失组合。

[0165] 术语“BMPRII多肽”包括包含BMPRII家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合体和肽模拟物形式)的多肽。除非另有说明，否则本文描述的蛋白质是人类形式。本文所述的所有BMPRII相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人BMPRII前体蛋白序列(SEQ ID NO:14)的编号，除非另外特别指出。

[0166] 人BMPRII前体(NCBI参考序列NP_001195.2)的未加工的经典亚型的氨基酸序列如下：

[0167]

```
  1 MTSSLQRPWR VPWLPWTILL VSTAAASQNQ ERLCAFKDPY QQDLGIGESR
 51 ISHENGTILC SKGSTCYGLW EKSKGDINLV KQGCWSHIGD PQECHYEECV
```

101 **VTTTPPSIQN GTYRFCCCST DLCNVNFTEN FPPPDTTPLS PPHSFNRDET**

151 IIIALASVSV LAVLIVALCF GYRMLTGDRK QGLHSMNMME AAASEPSLDL

201 DNLKLLELIG RGRYGAVYKG SLDERPVAVK VFSFANRQNF INEKNIYRVP

251 LMEHDNIARF IVGDERVTAD GRMEYLLVME YYPNGSLCKY LSLHTSDWVS

301 SCRLAHSVTR GLAYLHTELP RGDHYKPAIS HRDLNSRNVL VKNDGTCVIS

351 DFGLSMRLTG NRLVRPGEED NAAISEVGTI RYMAPEVLEG AVNLRDCESA

401 LKQVDMYALG LIYWEIFMRC TDLFPGESVP EYQMAFQTEV GNHPTFEDMQ

451 VLVSREKQRP KFPEAWKENS LAVRSLKETI EDCWDQDAEA RLTAQCAEER

501 MAELMMIWER NKSVSPTVNP MSTAMQNERN LSHNRRVPKI GPYPDYSSSS

551 YIEDSIHHTD SIVKNISSEH SMSSTPLTIG EKNRNSINYE RQQAQARIPS

[0168]

601 PETSVTSLST NTTTTNTTGL TPSTGMTTIS EMPYPDETNL HTTNVAQSIG

651 PTPVCLQLTE EDLETNKLDP KEVDKNLKES SDENLMEHSL KQFSGPDPLS

701 STSSSLLYPL IKLAVEATGQ QDFTQTANGQ ACLIPDVLPT QIYPLPKQQN

751 LPKRPTSLPL NTKNSTKEPR LKFGSKHKSN LKQVETGVAK MNTINAAEPH

801 VVTVTMNGVA GRNHSVNSHA ATTQYANGTV LSGQTTNIVT HRAQEMLQNQ

851 FIGEDTRLNI NSSPDEHEPL LRREQQAGHD EGVLDRLVDR RERPLEGGRT

901 NSNNNNSNPC SEQDVLAQGV PSTAADPGPS KPRRAQRPNS LDLSATNVLD

951 GSSIQIGEST QDGKSGSGEK IKKRVKTPYS LKRWRPSTWV ISTESLDCEV

1001 NNNGSNRAVH SKSSTAVYLA EGGTATTMVS KDIGMNCL

(SEQ ID NO: 14)

[0169] 信号肽是加下划线的,并且细胞外结构域用粗体表示。

[0170] 加工的细胞外BMPRII多肽的序列(SEQ ID NO:15)如下:

1 SQNQERLCAF KDPYQQDLGI GESRISHENG TILCSKGSTC YGLWEKSKGD

[0171] 51 INLVKQGCWS HIGDPQECHY EECVVTTTPP SIQNGTYRFC CCSTDLCNVN

101 FTENFPPPDT TPLSPPHSFN RDET (SEQ ID NO: 15)

[0172] 基于序列中半胱氨酸残基的定位,BMPRII多肽可以包含如下氨基酸序列,其从SEQ ID NO:15的氨基酸1、2、3、4、5、6、7或8处开始并且在SEQ ID NO:15的氨基酸97-124中的任何一个处结束。编码经典人BMPRII前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:16),其对应于NCBI参考序列NM_001204.6的核苷酸1149-4262。信号序列加下划线。

[0173] ATGACTTCCTCGCTGCAGCGGCCCTGGCGGGTGCCCTGGCTACCATGGACCATCCTGCTGGTCAGCACTGCGGCTGCTTCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCGTTTAAAGATCCGTATCAGCAAGACCTTGGGATAGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATATTATGCTCGAAAGGTAGCACCTGCTATGGCCTTTGGGAGAAATCAAAAGGGGACATAAATCTTGTAAAACAAGGATGTTGGTCTCACATTGGAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACTACCACTCCTCCCTCAATTCAGAATGGAACATACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAAT

GTCAACTTTACTGAGAATTTTCCACCTCCTGACACAACACCACTCAGTCCACCTCATTCATTTAACCGAGATGAGA
CAATAATCATTGCTTTGGCATCAGTCTCTGTATTAGCTGTTTTGATAGTTGCCTTATGCTTTGGATACAGAATGTT
GACAGGAGACCGTAAACAAGGTCTTCACAGTATGAACATGATGGAGGCAGCAGCATCCGAACCCTCTCTTGATCTA
GATAATCTGAAACTGTTGGAGCTGATTGGCCGAGGTCGATATGGAGCAGTATATAAAGGCTCCTTGGATGAGCGTC
CAGTTGCTGTAAAAGTGTTTTCCTTTGCAAACCGTCAGAATTTTATCAACGAAAAGAACATTTACAGAGTGCCTTT
GATGGAACATGACAACATTGCCCGCTTTATAGTTGGAGATGAGAGAGTCACTGCAGATGGACGCATGGAATATTTG
CTTGTGATGGAGTACTATCCCAATGGATCTTTATGCAAGTATTTAAGTCTCCACACAAGTGACTGGGTAAGCTCTT
GCCGTCTTGCTCATTCTGTTACTAGAGGACTGGCTTATCTTCACACAGAATTACCACGAGGAGATCATTATAAACC
TGCAATTTCCCATCGAGATTTAAACAGCAGAAATGTCCTAGTGAAAAATGATGGAACCTGTGTTATTAGTGACTTT
GGACTGTCCATGAGGCTGACTGGAAATAGACTGGTGCGCCCAGGGGAGGAAGATAATGCAGCCATAAGCGAGGTTG
GCACTATCAGATATATGGCACCAGAAGTGCTAGAAGGAGCTGTGAACTTGAGGGACTGTGAATCAGCTTTGAAACA
AGTAGACATGTATGCTCTTGGACTAATCTATTGGGAGATATTTATGAGATGTACAGACCTCTTCCCAGGGGAATCC
GTACCAGAGTACCAGATGGCTTTTCAGACAGAGGTTGGAAACCATCCCACTTTTGAGGATATGCAGGTTCTCGTGT
CTAGGGAAAAACAGAGACCCAAGTTCCCAGAAGCCTGGAAAGAAAATAGCCTGGCAGTGAGGTCACTCAAGGAGAC
AATCGAAGACTGTTGGGACCAGGATGCAGAGGCTCGGCTTACTGCACAGTGTGCTGAGGAAAGGATGGCTGAACTT
ATGATGATTTGGGAAAGAAACAAATCTGTGAGCCCAACAGTCAATCCAATGTCTACTGCTATGCAGAATGAACGCA
ACCTGTCACATAATAGGCGTGTGCCAAAAATTGGTCCTTATCCAGATTATTCTTCCTCCTCATACATTGAAGACTC
TATCCATCATACTGACAGCATCGTGAAGAATATTTCCTCTGAGCATTCTATGTCCAGCACACCTTTGACTATAGGG
GAAAAAAACCGAAATTCAATTAACTATGAACGACAGCAAGCACAAGCTCGAATCCCCAGCCCTGAAACAAGTGTCA
CCAGCCTCTCCACCAACACAACAACCACAAACACCACAGGACTCACGCCAAGTACTGGCATGACTACTATATCTGA
GATGCCATACCCAGATGAAACAAATCTGCATACCACAAATGTTGCACAGTCAATTGGGCCAACCCCTGTCTGCTTA
CAGCTGACAGAAGAAGACTTGGAAACCAACAAGCTAGACCCAAAAGAAGTTGATAAGAACCTCAAGGAAAGCTCTG
ATGAGAATCTCATGGAGCACTCTCTTAAACAGTTCAGTGGCCCAGACCCACTGAGCAGTACTAGTTCTAGCTTGCT
TTACCCACTCATAAAACTTGCAGTAGAAGCAACTGGACAGCAGGACTTCACACAGACTGCAAATGGCCAAGCATGT
TTGATTCCTGATGTTCTGCCTACTCAGATCTATCCTCTCCCCAAGCAGCAGAACCTTCCCAAGAGACCTACTAGTT
TGCCTTTGAACACCAAAAATTCAACAAAAGAGCCCCGGCTAAAATTTGGCAGCAAGCACAAATCAAACTTGAAACA
AGTCGAAACTGGAGTTGCCAAGATGAATACAATCAATGCAGCAGAACCTCATGTGGTGACAGTCACCATGAATGGT
GTGGCAGGTAGAAACCACAGTGTTAACTCCCATGCTGCCACAACCCAATATGCCAATGGGACAGTACTATCTGGCC
AAACAACCAACATAGTGACACATAGGGCCCAAGAAATGTTGCAGAATCAGTTTATTGGTGAGGACACCCGGCTGAA
TATTAATTCCAGTCCTGATGAGCATGAGCCTTTACTGAGACGAGAGCAACAAGCTGGCCATGATGAAGGTGTTCTG
GATCGTCTTGTGGACAGGAGGGAACGGCCACTAGAAGGTGGCCGAACTAATTCCAATAACAACAACAGCAATCCAT
GTTCAGAACAAGATGTTCTTGCACAGGGTGTTCCAAGCACAGCAGCAGATCCTGGGCCATCAAAGCCCAGAAGAGC
ACAGAGGCCTAATTCTCTGGATCTTTCAGCCACAAATGTCCTGGATGGCAGCAGTATACAGATAGGTGAGTCAACA
CAAGATGGCAAATCAGGATCAGGTGAAAAGATCAAGAAACGTGTGAAAACTCCCTATTCTCTTAAGCGGTGGCGCC
CCTCCACCTGGGTCATCTCCACTGAATCGCTGGACTGTGAAGTCAACAATAATGGCAGTAACAGGGCAGTTCATTC
CAAATCCAGCACTGCTGTTTACCTTGCAGAAGGAGGCACTGCTACAACCATGGTGTCTAAAGATATAGGAATGAAC
TGTCTG(SEQ ID NO:16)

[0174] 编码加工的细胞外BMPRII多肽的核酸序列(SEQ ID NO:17)如下：

[0175]

```
   1  TCGCAGAATC AAGAACGGCT ATGTGCGTTT AAAGATCCGT ATCAGCAAGA
  51  CCTTGGGATA GGTGAGAGTA GAATCTCTCA TGAAAATGGG ACAATATTAT
 101  GCTCGAAAGG TAGCACCTGC TATGGCCTTT GGGAGAAATC AAAAGGGGAC
 151  ATAAATCTTG TAAAACAAGG ATGTTGGTCT CACATTGGAG ATCCCCAAGA
 201  GTGTCACTAT GAAGAATGTG TAGTAACTAC CACTCCTCCC TCAATTCAGA
 251  ATGGAACATA CCGTTTCTGC TGTTGTAGCA CAGATTTATG TAATGTCAAC
 301  TTTACTGAGA ATTTTCCACC TCCTGACACA ACACCACTCA GTCCACCTCA
 351  TTCATTTAAC CGAGATGAGA CA      (SEQ ID NO: 17)
```

[0176] 已经报道了人BMPRII前体的较短亚型(亚型A),其含有与上述经典BMPRII前体相同的细胞外结构域序列。人BMPRII前体亚型A(NCBI登录号AAA86519.1)的氨基酸序列如下：

[0177]

[0178]

```
   1  MTSSLQRPWR VPWLPWTILL VSTAAASQNQ ERLCAFKDPY QQDLGIGESR
  51  ISHENGTILC SKGSTCYGLW EKSKGDINLV KQGCWSHIGD PQECHYEECV
 101  VTTTPPSIQN GTYRFCCCST DLCNVNFTEN FPPPDTTPLS PPHSFNRDET
 151  IIIALASVSV LAVLIVALCF GYRMLTGDRK QGLHSMNMME AAASEPSLDL
 201  DNLKLLELIG RGRYGAVYKG SLDERPVAVK VFSFANRQNF INEKNIYRVP
 251  LMEHDNIARF IVGDERVTAD GRMEYLLVME YYPNGSLCKY LSLHTSDWVS
 301  SCRLAHSVTR GLAYLHTELP RGDHYKPAIS HRDLNSRNVL VKNDGTCVIS
 351  DFGLSMRLTG NRLVRPGEED NAAISEVGTI RYMAPEVLEG AVNLRDCESA
 401  LKQVDMYALG LIYWEIFMRC TDLFPGESVP EYQMAFQTEV GNHPTFEDMQ
 451  VLVSREKQRP KFPEAWKENS LAVRSLKETI EDCWDQDAEA RLTAQCAEER
 501  MAELMMIWER NKSVSPTVNP MSTAMQNERR    (SEQ ID NO: 18)
```

[0179] 信号肽是加下划线的,并且细胞外结构域用粗体表示。

[0180] 编码人BMPRII前体蛋白的亚型A的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:19),其对应于NCBI登录号U25110.1的核苷酸163-1752。信号序列加下划线。ATGACTTCCTCGCTGCAGCGGCCCTGGCGGGTGCCCTGGCTACCATGGACCATCCTGCTGGTCAGCACTGCGGCTGCTTCGCAGAATCAAGAACGGCTATGTGCGTTTAAAGATCCGTATCAGCAAGACCTTGGGATAGGTGAGAGTAGAATCTCTCATGAAAATGGGACAATATTATGCTCGAAAGGTAGCACCTGCTATGGCCTTTGGGAGAAATCAAAAGGGGACATAAATCTTGTAAAACAAGGATGTTGGTCTCACATTGGAGATCCCCAAGAGTGTCACTATGAAGAATGTGTAGTAACTACCACTCCTCCCTCAATTCAGAATGGAACATACCGTTTCTGCTGTTGTAGCACAGATTTATGTAATGTCAACTTTACTGAGAATTTTCCACCTCCTGACACAACACCACTCAGTCCACCTCATTCATTTAACCGAGATGAGACAATAATCATTGCTTTGGCATCAGTCTCTGTATTAGCTGTTTTGATAGTTGCCTTATGCTTTGGATACAGAATGTTGACAGGAGACCGTAAACAAGGTCTTCACAGTATGAACATGATGGAGGCAGCAGCATCCGAACCCTCTCTTGATCTAGATAATCTGAAACTGTTGGAGCTGATTGGCCGAGGTCGATATGGAGCAGTATATAAAGGCTCCTTGGATGAGCGTCCAGTTGCTGTAAAAGTGTTTTCCTTTGCAAACCGTCAGAATTTTATCAACGAAAAGAACATTTACAGAGTGCCTTTGATGGAACATGACAACATTGCCCGCTTTATAG

TTGGAGATGAGAGAGTCACTGCAGATGGACGCATGGAATATTTGCTTGTGATGGAGTACTATCCCAATGGATCTTT
ATGCAAGTATTTAAGTCTCCACACAAGTGACTGGGTAAGCTCTTGCCGTCTTGCTCATTCTGTTACTAGAGGACTG
GCTTATCTTCACACAGAATTACCACGAGGAGATCATTATAAACCTGCAATTTCCCATCGAGATTTAAACAGCAGAA
ATGTCCTAGTGAAAAATGATGGAACCTGTGTTATTAGTGACTTTGGACTGTCCATGAGGCTGACTGGAAATAGACT
GGTGCGCCCAGGGGAGGAAGATAATGCAGCCATAAGCGAGGTTGGCACTATCAGATATATGGCACCAGAAGTGCTA
GAAGGAGCTGTGAACTTGAGGGACTGTGAATCAGCTTTGAAACAAGTAGACATGTATGCTCTTGGACTAATCTATT
GGGAGATATTTATGAGATGTACAGACCTCTTCCCAGGGGAATCCGTACCAGAGTACCAGATGGCTTTTCAGACAGA
GGTTGGAAACCATCCCACTTTTGAGGATATGCAGGTTCTCGTGTCTAGGGAAAAACAGAGACCCAAGTTCCCAGAA
GCCTGGAAAGAAAATAGCCTGGCAGTGAGGTCACTCAAGGAGACAATCGAAGACTGTTGGGACCAGGATGCAGAGG
CTCGGCTTACTGCACAGTGTGCTGAGGAAAGGATGGCTGAACTTATGATGATTTGGGAAAGAAACAAATCTGTGAG
CCCAACAGTCAATCCAATGTCTACTGCTATGCAGAATGAACGTAGG(SEQ ID NO:19)

[0181] 被称为三指毒素折叠的定义结构基序对于通过TGFβ超家族I型和II型受体的配体结合而言是重要的,并且由位于每个单体受体的细胞外结构域内的不同位置处的10、12或14个保守的半胱氨酸残基形成。参见例如Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;Galat(2011)Cell Mol Life Sci68:3437-3451;Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870。由这些保守的半胱氨酸的最外侧界定的、BMPRII受体的核心配体结合结构域包含SEQ ID NO:14的位置34-123。预期从SEQ ID NO:14的氨基酸34(ECD的起始半胱氨酸)处或之前开始并且在SEQ ID NO:14的氨基酸123(ECD的最后一个半胱氨酸)处或之后结束的BMPRII多肽将保留配体结合活性。因此,结合配体的BMPRII多肽的例子包括例如包含如下氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列从SEQ ID NO:14的氨基酸27-34(27、28、29、30、31、32、33或34)中的任何一个处开始并且在SEQ ID NO:14的氨基酸123-150(123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150)中的任何一个处结束。在一些实施方案中,本公开文本的BMPRII多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸34-123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。在一些实施方案中,本公开文本的BMPRII多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸27-150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。在一些实施方案中,本公开文本的BMPRII多肽包含与SEQ ID NO:14的27-123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。在一些实施方案中,本公开文本的BMPRII多肽包含与SEQ ID NO:14的34-150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。在某些实施方案中,BMPRII多肽与BMP9、BMP10、BMP15和/或激活素B结合,并且BMPRII多肽不显示与经典BMP(如BMP2、BMP4、BMP6和/或BMP7)的明显结合。例如,可以使用溶液中或表面等离子体共振系统(如Biacore™系统)中的纯化蛋白质评估结合。

[0182] 术语“ALK1多肽”包括如下多肽,所述多肽包含ALK1家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。

[0183] 人ALK1前体蛋白序列(NCBI Ref Seq NP_000011.2)如下:

1 MTLGSPRKGL LMLLMALVTQ G**DPVKPSRGP LVTCTCESPH CKGPTCRGAW**

51 CTVVLVREEG RHPQEHRGCG NLHRELCRGR PTEFVNHYCC DSHLCNHNVS

101 LVLEATQPPS EQPGTDGQLA LILGPVLALL ALVALGVLGL WHVRRRQEKQ

151 RGLHSELGES SLILKASEQG DSMLGDLLDS DCTTGSGSGL PFLVQRTVAR

201 QVALVECVGK GRYGEVWRGL WHGESVAVKI FSSRDEQSWF RETEIYNTVL

[0184] 251 LRHDNILGFI ASDMTSRNSS TQLWLITHYH EHGSLYDFLQ RQTLEPHLAL

301 RLAVSAACGL AHLHVEIFGT QGKPAIAHRD FKSRNVLVKS NLQCCIADLG

351 LAVMHSQGSD YLDIGNNPRV GTKRYMAPEV LDEQIRTDCF ESYKWTDIWA

401 FGLVLWEIAR RTIVNGIVED YRPPFYDVVP NDPSFEDMKK VVCVDQQTPT

451 IPNRLAADPV LSGLAQMMRE CWYPNPSARL TALRIKKTLQ KISNSPEKPK

501 VIQ (SEQ ID NO: 20)

[0185] 信号肽由单下划线指示，并且细胞外结构域以粗体字指示。

[0186] 加工的细胞外ALK1多肽序列如下：

[0187] DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQ(SEQ ID NO:21)

[0188] 编码人ALK1前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:22)，其对应于Genbank参考序列NM_000020.2的核苷酸284-1792。信号序列加下划线。

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGACCCAGGGA

[0189] **GACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCCACATTGCAAG**

GGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGCACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCC

CAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTC

GTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCC

ACCCAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGCTGGCCCTGATCCTGGGCCCCGTG

CTGGCCTTGCTGGCCCTGGTGGCCCTGGGTGTCCTGGGCCTGTGGCATGTCCGACGGAGGCAG

GAGAAGCAGCGTGGCCTGCACAGCGAGCTGGGAGAGTCCAGTCTCATCCTGAAAGCATCTGAG

CAGGGCGACAGCATGTTGGGGGACCTCCTGGACAGTGACTGCACCACAGGGAGTGGCTCAGGG

CTCCCCTTCCTGGTGCAGAGGACAGTGGCACGGCAGGTTGCCTTGGTGGAGTGTGTGGGAAAA

GGCCGCTATGGCGAAGTGTGGCGGGGCTTGTGGCACGGTGAGAGTGTGGCCGTCAAGATCTTC

TCCTCGAGGGATGAACAGTCCTGGTTCCGGGAGACTGAGATCTATAACACAGTGTTGCTCAGA

CACGACAACATCCTAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTCCCGCAACTCGAGCACGCAGCTG

TGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTACGACTTTCTGCAGAGACAGACGCTG

[0190] GAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGCGGCATGCGGCCTGGCGCACCTGCACGTG

GAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACCAGCCATTGCCCACCGCGACTTCAAGAGCCGCAATGTG

CTGGTCAAGAGCAACCTGCAGTGTTGCATCGCCGACCTGGGCCTGGCTGTGATGCACTCACAG

GGCAGCGATTACCTGGACATCGGCAACAACCCGAGAGTGGGCACCAAGCGGTACATGGCACCC

GAGGTGCTGGACGAGCAGATCCGCACGGACTGCTTTGAGTCCTACAAGTGGACTGACATCTGG

GCCTTTGGCCTGGTGCTGTGGGAGATTGCCCGCCGGACCATCGTGAATGGCATCGTGGAGGAC

TATAGACCACCCTTCTATGATGTGGTGCCCAATGACCCCAGCTTTGAGGACATGAAGAAGGTG

GTGTGTGTGGATCAGCAGACCCCCACCATCCCTAACCGGCTGGCTGCAGACCCGGTCCTCTCA

GGCCTAGCTCAGATGATGCGGGAGTGCTGGTACCCAAACCCCTCTGCCCGACTCACCGCGCTG

CGGATCAAGAAGACACTACAAAAAATTAGCAACAGTCCAGAGAAGCCTAAAGTGATTCAA

(SEQ ID NO: 22)

[0191] 编码加工的细胞外ALK1多肽的核酸序列如下：

[0192] GACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCC TACCTGCCGGGGGGCCTGGTGCACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGC GGGAACTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCACCTCT GCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAG(SEQ ID NO:23)

[0193] 如上所讨论的，被称为三指毒素折叠的定义结构基序对于通过TGFβ超家族I型和II型受体的配体结合而言是重要的，并且由位于每个单体受体的细胞外结构域内的不同位置处的10、12或14个保守的半胱氨酸残基形成。由这些保守的半胱氨酸的最外侧界定的、ALK1受体的核心配体结合结构域包含SEQ ID NO:20的位置34-95。预期从SEQ ID NO:20的氨基酸34(ECD的首个半胱氨酸)处或之前开始并且在SEQ ID NO:20的氨基酸95(ECD的最后一个半胱氨酸)处或之后结束的ALK1多肽将保留配体结合活性。因此，结合配体的ALK1多肽的例子包括例如包含如下氨基酸序列的多肽，所述氨基酸序列从SEQ ID NO:20的氨基酸22-34(22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34)中的任何一个处开始并且在SEQ ID

NO:20的氨基酸95-118(95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117或118)中的任何一个处结束。在一些实施方案中,本公开文本的ALK1多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸34-95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。在一些实施方案中,本公开文本的ALK1多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸22-118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。在一些实施方案中,本公开文本的ALK1多肽包含与SEQ ID NO:20的22-95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。在一些实施方案中,本公开文本的ALK1多肽包含与SEQ ID NO:20的34-95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。在某些实施方案中,ALK1多肽与BMP9和BMP10结合。例如,可以使用溶液中或表面等离子体共振系统(如Biacore™系统)中的纯化蛋白质评估结合。

[0194] 术语“内皮糖蛋白多肽”包括如下多肽,所述多肽包含内皮糖蛋白家族成员的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。

[0195] 人内皮糖蛋白亚型1前体蛋白序列(GenBank NM_001114753)如下:

[0196]
```
  1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
 61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
241 SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAYS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVP
```

[0197]
```
541 IPKTGTLSCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLS GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSHTRSP SKREPVVAVA APASSESSST NHSIGSTQST PCSTSSMA

    (SEQ ID NO: 24)
```

[0198] 前导序列和预测的跨膜结构域均由单下划线指示。

[0199] 编码人内皮糖蛋白亚型1前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:25;Genbank参考序列NM_001114753)。前导序列和预测的跨膜结构域均由单下划线指示。

```
          1  ATGGACCGCG GCACGCTCCC TCTGGCTGTT GCCCTGCTGC TGGCCAGCTG
         51  CAGCCTCAGC CCCACAAGTC TTGCAGAAAC AGTCCATTGT GACCTTCAGC
        101  CTGTGGGCCC CGAGAGGGGC GAGGTGACAT ATACCACTAG CCAGGTCTCG
        151  AAGGGCTGCG TGGCTCAGGC CCCCAATGCC ATCCTTGAAG TCCATGTCCT
        201  CTTCCTGGAG TTCCCAACGG GCCCGTCACA GCTGGAGCTG ACTCTCCAGG
        251  CATCCAAGCA AAATGGCACC TGGCCCCGAG AGGTGCTTCT GGTCCTCAGT
        301  GTAAACAGCA GTGTCTTCCT GCATCTCCAG GCCCTGGGAA TCCCACTGCA
        351  CTTGGCCTAC AATTCCAGCC TGGTCACCTT CCAAGAGCCC CCGGGGGTCA
        401  ACACCACAGA GCTGCCATCC TTCCCCAAGA CCCAGATCCT TGAGTGGGCA
        451  GCTGAGAGGG GCCCCATCAC CTCTGCTGCT GAGCTGAATG ACCCCCAGAG
[0200]  501  CATCCTCCTC CGACTGGGCC AAGCCCAGGG GTCACTGTCC TTCTGCATGC
        551  TGGAAGCCAG CCAGGACATG GGCCGCACGC TCGAGTGGCG GCCGCGTACT
        601  CCAGCCTTGG TCCGGGGCTG CCACTTGGAA GGCGTGGCCG GCCACAAGGA
        651  GGCGCACATC CTGAGGGTCC TGCCGGGCCA CTCGGCCGGG CCCCGGACGG
        701  TGACGGTGAA GGTGGAACTG AGCTGCGCAC CCGGGGATCT CGATGCCGTC
        751  CTCATCCTGC AGGGTCCCCC CTACGTGTCC TGGCTCATCG ACGCCAACCA
        801  CAACATGCAG ATCTGGACCA CTGGAGAATA CTCCTTCAAG ATCTTTCCAG
        851  AGAAAAACAT TCGTGGCTTC AAGCTCCCAG ACACACCTCA AGGCCTCCTG
        901  GGGGAGGCCC GGATGCTCAA TGCCAGCATT GTGGCATCCT TCGTGGAGCT
        951  ACCGCTGGCC AGCATTGTCT CACTTCATGC CTCCAGCTGC GGTGGTAGGC
       1001  TGCAGACCTC ACCCGCACCG ATCCAGACCA CTCCTCCCAA GGACACTTGT
```

1051 AGCCCGGAGC TGCTCATGTC CTTGATCCAG ACAAAGTGTG CCGACGACGC

1101 CATGACCCTG GTACTAAAGA AAGAGCTTGT TGCGCATTTG AAGTGCACCA

1151 TCACGGGCCT GACCTTCTGG GACCCCAGCT GTGAGGCAGA GGACAGGGGT

1201 GACAAGTTTG TCTTGCGCAG TGCTTACTCC AGCTGTGGCA TGCAGGTGTC

1251 AGCAAGTATG ATCAGCAATG AGGCGGTGGT CAATATCCTG TCGAGCTCAT

1301 CACCACAGCG GAAAAAGGTG CACTGCCTCA ACATGGACAG CCTCTCTTTC

1351 CAGCTGGGCC TCTACCTCAG CCCACACTTC CTCCAGGCCT CCAACACCAT

1401 CGAGCCGGGG CAGCAGAGCT TTGTGCAGGT CAGAGTGTCC CCATCCGTCT

1451 CCGAGTTCCT GCTCCAGTTA GACAGCTGCC ACCTGGACTT GGGGCCTGAG

[0201] 1501 GGAGGCACCG TGGAACTCAT CCAGGGCCGG GCGGCCAAGG GCAACTGTGT

1551 GAGCCTGCTG TCCCCAAGCC CCGAGGGTGA CCCGCGCTTC AGCTTCCTCC

1601 TCCACTTCTA CACAGTACCC ATACCCAAAA CCGGCACCCT CAGCTGCACG

1651 GTAGCCCTGC GTCCCAAGAC CGGGTCTCAA GACCAGGAAG TCCATAGGAC

1701 TGTCTTCATG CGCTTGAACA TCATCAGCCC TGACCTGTCT GGTTGCACAA

1751 GCAAAGGCCT CGTCCTGCCC GCCGTGCTGG GCATCACCTT TGGTGCCTTC

1801 CTCATCGGGG CCCTGCTCAC TGCTGCACTC TGGTACATCT ACTCGCACAC

1851 GCGTTCCCCC AGCAAGCGGG AGCCCGTGGT GGCGGTGGCT GCCCCGGCCT

1901 CCTCGGAGAG CAGCAGCACC AACCACAGCA TCGGGAGCAC CCAGAGCACC

1951 CCCTGCTCCA CCAGCAGCAT GGCA

[0202] (SEQ ID NO:25)

[0203] 人内皮糖蛋白亚型2前体蛋白序列(GenBank NM_001114753)如下：

1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA

61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY

121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS

[0204] 181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL

241 SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL

301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ

361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAYS SCGMQVSASM

421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS

481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVP

[0205] 541 IPKTGTLSCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLS GCTSKGLVLP AVLGITFGAF

601 LIGALLTAAL WYIYSHTREY PRPPQ (SEQ ID NO: 26)

[0206] 前导序列和预测的跨膜结构域均由单下划线指示。

[0207] 编码人ALK1亚型2前体蛋白的核酸序列如下所示(SEQ ID NO:27;Genbank参考序列NM_001114753)。前导序列和预测的跨膜结构域均由单下划线指示。

[0208] ATGGACCGCGGCACGCTCCCTCTGGCTGTTGCCCTGCTGCTGGCCAGCTGCAGCCTCAGCCCCACAAGTCTTGCAGAAACAGTCCATTGTGACCTTCAGCCTGTGGGCCCCGAGAGGGGCGAGGTGACATATACCACTAGCCAGGTCTCGAAGGGCTGCGTGGCTCAGGCCCCCAATGCCATCCTTGAAGTCCATGTCCTCTTCCTGGAGTTCCCAACGGGCCCGTCACAGCTGGAGCTGACTCTCCAGGCATCCAAGCAAAATGGCACCTGGCCCCGAGAGGTGCTTCTGGTCCTCAGTGTAAACAGCAGTGTCTTCCTGCATCTCCAGGCCCTGGGAATCCCACTGCACTTGGCCTACAATTCCAGCCTGGTCACCTTCCAAGAGCCCCCGGGGGTCAACACCACAGAGCTGCCATCCTTCCCCAAGACCCAGATCCTTGAGTGGGCAGCTGAGAGGGGCCCCATCACCTCTGCTGCTGAGCTGAATGACCCCCAGAGCATCCTCCTCCGACTGGGCCAAGCCCAGGGGTCACTGTCCTTCTGCATGCTGGAAGCCAGCCAGGACATGGGCCGCACGCTCGAGTGGCGGCCGCGTACTCCAGCCTTGGTCCGGGGCTGCCACTTGGAAGGCGTGGCCGGCCACAAGGAGGCGCACATCCTGAGGGTCCTGCCGGGCCACTCGGCCGGGCCCCGGACGGTGACGGTGAAGGTGGAACTGAGCTGCGCACCCGGGGATCTCGATGCCGTCCTCATCCTGCAGGGTCCCCCCTACGTGTCCTGGCTCATCGACGCCAACCACAACATGCAGATCTGGACCACTGGAGAATACTCCTTCAAGATCTTTCCAGAGAAAAACATTCGTGGCTTCAAGCTCCCAGACACACCTCAAGGCCTCCTGGGGGAGGCCCGGATGCTCAATGCCAGCATTGTGGCATCCTTCGTGGAGCTACCGCTGGCCAGCATTGTCTCACTTCATGCCTCCAGCTGCGGTGGTAGGCTGCAGACCTCACCCGCACCGATCCAGACCACTCCTCCCAAGGACACTTGTAGCCCGGAGCTGCTCATGTCCTTGATCCAGACAAAGTGTGCCGACGACGCCATGACCCTGGTACTAAAGAAAGAGCTTGTTGCGCATTTGAAGTGCACCATCACGGGCCTGACCTTCTGGGACCCCAGCTGTGAGGCAGAGGACAGGGGTGACAAGTTTGTCTTGCGCAGTGCTTACTCCAGCTGTGGCATGCAGGTGTCAGCAAGTATGATCAGCAATGAGGCGGTGGTCAATATCCTGTCGAGCTCATCACCACAGCGGAAAAAGGTGCACTGCCTCAACATGGACAGCCTCTCTTTCCAGCTGGGCCTCTACCTCAGCCCACACTTCCTCCAGGCCTCCAACACCATCGAGCCGGGGCAGCAGAGCTTTGTGCAGGTCAGAGTGTCCCCATCCGTCTCCGAGTTCCTGCTCCAGTTAGACAGCTGCCACCTGGACTTGGGGCCTGAGGGAGGCACCGTGGAACTCATCCAGGGCCGGGCGGCCAAGGGCAACTGTGTGAGCCTGCTGTCCCCAAGCCCCGAGGGTGACCCGCGCTTCAGCTTCCTCCTCCACTTCTACACAGTACCCATACCCAAAACCGGCACCCTCAGCTGCACGGTAGCCCTGCGTCCCAAGACCGGGTCTCAAGACCAGGAAGTCCATAGGACTGTCTTCATGCGCTTGAACATCATCAGCCCTGACCTGTCTGGTTGCACAAGCAAAGGCCTCGTCCTGCCCGCCGTGCTGGGCATCACCTTTGGTGCCTTCCTCATCGGGGCCCTGCTCACTGCTGCACTCTGGTACATCTACTCGCACACGCGTGAGTACCCCAGGCCCCCACAG

[0209] (SEQ ID NO:27)

[0210] 申请人先前已经证明,包含ENG多肽的较短C末端截短变体的Fc融合蛋白没有显示出与TGF-β1和TGF-β3明显的结合,而是与ENG(26-437)-Fc或包含全长ENG ECD的Fc融合蛋白相比,显示出以显著较慢的解离速率与BMP9的较高亲和力结合(参见例如US 2015/0307588,其传授通过引用以其全文并入本文)。具体地,发现在SEQ ID NO:24的氨基酸378、359和346处结束的C末端截短变体全部以与ENG(26-437)或ENG(26-586)相比基本上较高的亲和力结合BMP9(并且以未降低的亲和力结合BMP10)。然而,与BMP9和BMP10的结合通过对氨基酸332、329或257的更广泛的C末端截短被完全破坏。因此,预期在氨基酸333与氨基酸378之间终止的ENG多肽都是有活性的,但在氨基酸346和359处或在氨基酸346与359之间结束的构建体可能是最具活性的。预测在氨基酸360和378处或在氨基酸360与378之间的形式趋向于ENG(26-378)所示的中间体配体结合亲和力。基于与包含全长ENG ECD的融合蛋白相

比，使用ENG(26-346)-Fc观察到的蛋白质表达和消除半衰期的改善，预期在氨基酸333和378处或氨基酸333与378之间结束的某些构建体的情况下其他关键参数的改善(参见例如US 2015/0307588)。取决于临床或实验设置，可能需要使用这些截短变体形式中的任何一种。

[0211] 在N末端处，预期从SEQ ID NO:24的氨基酸26(起始谷氨酸)或之前开始的ENG多肽将保留配体结合活性。如本文和US 2015/0307588中所述，SEQID NO:24的氨基酸61的N末端截短消除了配体结合，更广泛的N末端截短也是如此。然而，也如本文所公开的，ENG一级序列的一致性建模(consensus modeling)指示，SEQ ID NO:24的氨基酸26-60所定义的区域内的有序二级结构限于以高置信度预测的在SEQ ID NO:24的位置42-45处的四残基β链和以极低置信度预测的在SEQ ID NO:24的位置28-29处的两残基β链。因此，活性ENG多肽将优先在SEQ ID NO:24的氨基酸26处(或之前)，或在氨基酸27-42中的任何一个处开始。

[0212] 总之，ENG多肽的活性部分可以包含从SEQ ID NO:24的氨基酸27-42中的任何一个(例如，27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41或42)处开始并且在SEQ ID NO:24的氨基酸333-378中的任何一个(333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、277或378)处结束的氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:24的相应部分具有至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。例如，活性ENG多肽可以包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列26-333、26-334、26-335、26-336、26-337、26-338、26-339、26-340、26-341、26-342、26-343、26-344、26-345或26-346，以及在SEQ ID NO:24的氨基酸27-42中的任何一个处开始的这些序列的变体。示例性ENG多肽包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列26-346、26-359和26-378。还考虑了这些范围内的变体，特别是与SEQ ID NO:24的相应部分具有至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的变体。ENG多肽可以不包括由SEQ ID NO:24的氨基酸379-430组成的序列。在某些实施方案中，ENG多肽与BMP-9和BMP-10结合，并且ENG多肽不显示与TGF-β1或TGF-β3的明显结合。可以使用溶液中或表面等离子体共振系统(如Biacore™系统)中的纯化蛋白质评估结合。

[0213] ENG多肽可以另外包括N末端处的多种前导序列中的任何一种。这个序列将允许在真核系统中表达所述肽并使其靶向分泌途径。参见例如，Ernst等人，美国专利号5,082,783(1992)。可替代地，可以使用天然ENG信号序列来实现从细胞挤出。可能的前导序列包括蜜蜂峰毒肽、TPA和天然前导序列。信号肽的加工可能根据所选择的前导序列、所用的细胞类型和培养条件以及其他变量而变化，因此成熟ENG多肽的实际N末端起始位点可能会在N末端或C末端方向上移位1、2、3、4或5个氨基酸。成熟ENG-Fc融合蛋白的例子包括SEQ ID NO:28-31，如下加下划线的ENG多肽部分所示。

[0214] 人ENG(26-378)-hFc(截短的Fc)

[0215]
ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF

PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN

SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR

LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL

RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI

WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS

IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLIQT KCADDAMTLV

[0216]

LKKELVATGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC

VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ

DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN

QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT

VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 28)

[0217] 人ENG(26-359)-hFc

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF

PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN

SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR

LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL

RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI

WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS

[0218]

IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGPKSCDKTH

TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK

FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS

NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP

SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 29)

[0219] 人ENG(26-359)-hFc(截短的Fc)

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF

PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN

SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR

[0220]

LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL

RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI

WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS

[0221] IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 30)

[0222] 人ENG(26-346)-hFc(截短的Fc)

[0223] ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPTGGGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 31)

[0224] 在一些实施方案中，本公开文本考虑通过修饰BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的结构来制备功能性变体，以用于这样的目的如增强治疗功效或稳定性(例如，保质期和对体内蛋白质水解降解的抗性)。变体可以通过氨基酸取代、缺失、添加或其组合来产生。例如，合理地预期用异亮氨酸或缬氨酸分离置换亮氨酸、用谷氨酸分离置换天冬氨酸、用丝氨酸分离置换苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地置换氨基酸(例如，保守突变)将不会对所得分子的生物活性具有重大影响。保守性置换是在它们的侧链中相关的氨基酸的家族内发生的那些置换。通过评估变体多肽以类似于野生型多肽的方式在细胞中产生反应或者与一种或多种TGF-β配体结合的能力，可以容易地确定本公开文本的多肽的氨基酸序列的变化是否导致功能同源物，所述一种或多种TGF-β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-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、nodal、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经营养因子、artemin、persephin、MIS和Lefty。

[0225] 在某些实施方案中，本公开文本考虑了BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的特定突变，以便改变多肽的糖基化。可以选择此类突变以引入或消除一个或多个糖基化位点，如O-连接或N-连接的糖基化位点。天冬酰胺连接糖基

化识别位点通常包含三肽序列天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸(其中“X”是任何氨基酸),所述三肽序列由适当的细胞糖基化酶特异性识别。也可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加或取代至多肽序列来进行改变(对于O-连接的糖基化位点)。糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置中的一个或两个处的多种氨基酸取代或缺失(和/或第二位置处的氨基酸缺失)导致修饰的三肽序列处的非糖基化。增加多肽上碳水化合物部分的数目的另一种手段是通过将糖苷与多肽进行化学或酶促偶联。根据所用的偶联模式,可以将一种或多种糖附接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基基团;(c)游离巯基基团如半胱氨酸的游离巯基;(d)游离羟基基团如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基;(e)芳香族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香族残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。除去多肽上存在的一个或多个碳水化合物部分可以化学和/或酶促地完成。化学去糖基化可以涉及例如将多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外的大多数或所有糖切割,同时留下氨基酸序列为完整的。多肽上的碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用多种内切糖苷酶和外切糖苷酶来实现,如Thotakura等人[Meth.Enzymol.(1987)138:350]所述。可以根据所用表达系统的类型适当地调节多肽的序列,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞都可以引入可能受肽的氨基酸序列的影响的不同糖基化模式。一般来说,用于在人类中使用的本公开文本的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽可以在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系(如HEK293或CHO细胞系)中表达,但预期其他哺乳动物表达细胞系也是有用的。

[0226] 本公开文本还考虑了生成突变体,特别是BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽以及截短突变体的组合突变体的组的方法。组合突变体的库尤其可用于鉴定功能活性的(例如,结合TGF-β超家族配体的)ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽序列。筛选此类组合文库的目的可以是产生例如具有改变的特性(如改变的药代动力学或改变的配体结合)的多肽变体。下文提供了多种筛选测定,并且此类测定可以用于评价变体。例如,针对与一种或多种TGF-β超家族配体(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-β1、TGF-β2、TGF-β3、激活素A、激活素B、激活素AB、激活素AC、nodal、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经生长因子、artemin、persephin、MIS和Lefty)结合以防止TGF-β超家族配体与TGF-β超家族受体的结合和/或干扰由TGF-β超家族配体引起的信号传导的能力,可以筛选BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽变体。

[0227] BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的活性也可以在基于细胞的测定中或在体内测试。例如,可以评估BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽对参与肌肉细胞中肌肉产生的基因的表达的影响。根据需要,这可以在一种或多种重组TGF-β超家族配体蛋白(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-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、nodal、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经生长因子、artemin、persephin、MIS和Lefty)的存在下进行,并且可以转染细胞以产生BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽以及任选的TGF-

β超家族配体。同样地，可以将BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽给予至小鼠或其他动物，并且可以使用本领域公认的方法评估一个或多个量度如肌肉形成和强度。类似地，可以在癌细胞中测试BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽或其变体的活性对这些细胞生长的任何影响，例如通过本文所述的测定和本领域常识所知的测定来测试。SMAD反应性报告基因可以在此类细胞系中用于监测对下游信号传导的影响。

[0228] 可以生成组合衍生的变体，其相对于参考BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽具有增加的选择性或通常增加的效力。此类变体在从重组DNA构建体表达时可以用于基因疗法方案中。同样地，诱变可以产生如下变体，其具有与相应的未修饰的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽显著不同的细胞内半衰期。例如，可以使经改变的蛋白质对于蛋白水解降解或导致未经修饰的多肽的破坏或以其他方式失活的其他细胞过程更稳定或更不稳定。此类变体和编码它们的基因可以用于通过调节多肽的半衰期来改变多肽复合物水平。例如，短半衰期可以产生更短暂的生物学作用，并且在诱导型表达系统的一部分时，可以允许更严格地控制细胞内的重组多肽复合物水平。在Fc融合蛋白中，可以在接头(如果有的话)和/或Fc部分中进行突变以改变BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的半衰期。

[0229] 组合文库可以通过编码多肽文库的基因的简并文库产生，所述多肽均至少包含潜在的ActRII BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽序列的至少一部分。例如，可以将合成寡核苷酸的混合物酶促地连接至基因序列中，使得潜在的ActRII BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽编码核苷酸序列的简并组可以作为单独的多肽表达，或者可替代地作为一组较大的融合蛋白表达(例如，用于噬菌体展示)。

[0230] 有许多方式可以由简并寡核苷酸序列产生潜在的同源物的文库。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行，然后可以将合成基因连接至适当的载体中进行表达。简并寡核苷酸的合成是本领域公知的[Narang,SA(1983)Tetrahedron 39:3;Itakura等人(1981)Recombinant DNA,Proc.3rdCleveland Sympos.Macromolecules,编辑AG Walton,Amsterdam:Elsevier第273-289页;Itakura等人(1984)Annu.Rev.Biochem.53:323;Itakura等人(1984)Science 198:1056;和Ike等人(1983)Nucleic Acid Res.11:477]。此类技术已经用于其他蛋白质的定向进化[Scott等人,(1990)Science 249:386-390;Roberts等人(1992)PNAS USA 89:2429-2433;Devlin等人(1990)Science 249:404-406;Cwirla等人,(1990)PNAS USA 87:6378-6382;以及美国专利号:5,223,409、5,198,346和5,096,815]。

[0231] 可替代地，其他形式的诱变可以用于产生组合文库。例如，可以通过使用以下方法进行筛选而从文库产生和分离本公开文本的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽：例如丙氨酸扫描诱变[Ruf等人(1994)Biochemistry 33:1565-1572;Wang等人(1994)J.Biol.Chem.269:3095-3099;Balint等人(1993)Gene 137:109-118;Grodberg等人(1993)Eur.J.Biochem.218:597-601;Nagashima等人(1993)J.Biol.Chem.268:2888-2892;Lowman等人(1991)Biochemistry 30:10832-10838;和Cunningham等人(1989)Science 244:1081-1085]、通过接头扫描诱变[Gustin等人(1993)

Virology 193:653-660;和Brown等人(1992)Mol.Cell Biol.12:2644-2652;McKnight等人(1982)Science 232:316]、通过饱和诱变[Meyers等人,(1986)Science 232:613]、通过PCR诱变[Leung等人(1989)Method Cell Mol Biol 1:11-19]或通过随机诱变,包括化学诱变[Miller等人(1992)A Short Course in Bacterial Genetics,CSHL Press,Cold Spring Harbor,NY;和Greener等人(1994)Strategies in Mol Biol 7:32-34]。接头扫描诱变特别是在组合设置中是用于鉴定BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的截短(生物活性)形式的有吸引力的方法。

[0232] 本领域已知广泛范围的技术用于筛选通过点突变和截短产生的组合文库的基因产物,并且就此而言,所述技术用于筛选具有某种特性的基因产物的cDNA文库。此类技术通常适用于快速筛选由BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的组合诱变生成的基因文库。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将所述基因文库克隆至可复制的表达载体中,用所得载体文库转化适当的细胞以及在检测所需活性促进相对容易地分离编码基因(所述基因的产物被检测到)的载体的条件下表达所述组合基因。优选的测定包括TGF-β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、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、nodal、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经营养因子、artemin、persephin、MIS和Lefty)结合测定和/或TGF-β配体介导的细胞信号传导测定。

[0233] 在某些实施方案中,BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽除了包含ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽中天然存在的任何修饰外,还可以包含翻译后修饰。此类修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、酯化和酰化。因此,BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽可以包含非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖和磷酸盐。可以如本文对于其他变体所述来测试此类非氨基酸元件对BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽的功能性的影响。当在细胞中通过切割新生形式的多肽产生本公开文本的多肽时,翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和/或功能而言也可能是重要的。不同的细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有特定的细胞机制和这种翻译后活性的特征性机制,并且可以进行选择以确保ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白或BMP10前肽多肽的正确修饰和加工。

[0234] 在某些方面,本公开文本的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽是至少包含ActRII多肽(例如,ActRIIA或ActRIIB多肽)、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白或BMP10前肽多肽的一部分(结构域)和一个或多个异源部分(结构域)的融合蛋白。此类融合结构域的公知的例子包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域以赋予所需的特性。例如,一些融合结构域特别适用于通过亲和色谱分离融合蛋白。出于亲和纯化的目的,使用亲和色谱的相关基质,诸如谷胱甘肽、淀粉酶和镍或钴缀合的树脂。许多此类基质可以“试剂盒”形式获得,如可与(HIS_6)融合配偶体一起使用的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress™系统(Qiagen)。作为另一个例子,可以选择融合结构域以便于检测BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、

ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽。此类检测结构域的例子包括多种萦光蛋白(例如,GFP)以及“表位标签”,所述表位标签通常是可获得特异性抗体的短肽序列。可容易获得特异性单克隆抗体的公知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下,融合结构域具有如用于因子Xa或凝血酶的蛋白酶切割位点,其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白并且由此从中释放重组蛋白。然后可以通过后续色谱分离从融合结构域分离所释放的蛋白质。可以选择的其他类型的融合结构域包括多聚化(例如,二聚化、四聚化)结构域和功能结构域(其赋予另一生物学功能),包括例如来自免疫球蛋白的恒定结构域(例如,Fc结构域)。

[0235] 在某些方面,本公开文本的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽含有一种或多种能够“稳定”多肽的修饰。“稳定化”意指增加体外半衰期、血清半衰期的任何物质,不管这是由于破坏减少、肾脏清除率降低还是药剂的其他药代动力学效应所致。例如,此类修饰延长多肽的保质期,延长多肽的循环半衰期,和/或降低多肽的蛋白水解降解。此类稳定化修饰包括但不限于融合蛋白(包括例如包含BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽结构域和稳定结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括例如将糖基化位点添加至本公开文本的多肽)以及碳水化合物部分的修饰(包括例如从本公开文本的多肽去除碳水化合物部分)。如本文所用,术语“稳定结构域”不仅指在融合蛋白情况下的融合结构域(例如,免疫球蛋白Fc结构域),而且包括非蛋白质修饰如碳水化合物部分或非蛋白质部分如聚乙二醇。在某些优选的实施方案中,BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽与使多肽稳定的异源结构域(“稳定”结构域)、优选增加体内多肽的稳定性的异源结构域融合。已知具有免疫球蛋白的恒定结构域(例如,Fc结构域)的融合物对广泛范围的蛋白质赋予期望的药代动力学特性。同样,与人血清白蛋白的融合物可以赋予期望的稳定化特性。

[0236] 在一些实施方案中,本公开文本的ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽是Fc融合蛋白。可用于人IgG1的Fc部分(G1Fc)的天然氨基酸序列的例子如下所示(SEQ ID NO:36)。虚下划线表示铰链区,并且实下划线表示具有天然存在的变体的位置。部分地,本公开文本提供了多肽,其包含与SEQ ID NO:36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,基本上由所述氨基酸序列组成,或由所述氨基酸序列组成。根据SEQ ID NO:36中使用的编号系统,G1Fc中天然存在的变体将包括E134D和M136L(参见Uniprot P01857)。

[0237]
```
  1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101  VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
```

[0238]
```
151  YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201  FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK        (SEQ ID NO: 36)
```

[0239] 任选地,IgG1Fc结构域具有在诸如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434等残基处的一个或多个突变。在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变中的一个或多个(例如,Asp-265突变)的突变型IgG1Fc结构域具有降低的结合至Fcγ受体的能力。在其他情况下,

相对于野生型IgG1Fc结构域，具有这些突变中的一个或多个(例如，Asn-434突变)的突变型Fc结构域具有增加的结合至MHC I类相关Fc受体(FcRN)的能力。

[0240] 可用于人IgG2的Fc部分(G2Fc)的天然氨基酸序列的例子如下所示(SEQID NO:37)。虚下划线表示铰链区，并且双下划线表示在所述序列中存在数据库冲突的位置(根据UniProt P01859)。部分地，本公开文本提供了多肽，其包含与SEQ ID NO:37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，基本上由所述氨基酸序列组成，或由所述氨基酸序列组成。

```
  1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
 51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101  NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151  SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201  CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK        (SEQ ID NO: 37)
```

[0241]

[0242] 可用于人IgG3的Fc部分(G3Fc)的氨基酸序列的两个例子如下所示。G3Fc中的铰链区可以是其他Fc链中的最多四倍，并且含有三个相同的15个残基的区段，其前面是相似的17个残基的区段。如下所示的第一G3Fc序列(SEQID NO:38)含有由单个15个残基的区段组成的短铰链区，而第二G3Fc序列(SEQ ID NO:39)含有全长铰链区。在每种情况下，虚下划线表示铰链区，并且实下划线表示具有天然存在的变体的位置(根据UniProt P01859)。部分地，本公开文本提供了如下多肽，其包含与SEQ ID NO:38或39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，基本上由所述氨基酸序列组成，或由所述氨基酸序列组成。

[0243]

```
  1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 51  VSHEDPEVQF KWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
101  GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151  TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201  RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK     (SEQ ID NO: 38)
```

[0244]

```
  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 NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251  QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK       (SEQ ID NO: 39)
```

[0245] 当转化为SEQ ID NO:38中使用的编号系统时，G3Fc中天然存在的变体(例如，参见Uniprot P01860)包括E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y，

并且本公开文本提供了包含含有这些变异中的一个或多个的G3Fc结构域的融合蛋白。另外，人免疫球蛋白IgG3基因(IGHG3)显示出以不同铰链长度为特征的结构多态性[参见UniprotP01859]。具体地，变体WIS缺少大部分V区和所有CH1区。除了通常存在于铰链区中的11之外，它还在位置7处具有额外的链间二硫键。变体ZUC缺少大部分V区、所有CH1区和部分铰链。变体OMM可以代表等位基因形式或另一个γ链亚类。本公开文本提供了另外的融合蛋白，其包含含有这些变体中的一种或多种的G3Fc结构域。

[0246] 可用于人IgG4的Fc部分(G4Fc)的天然氨基酸序列的例子如下所示(SEQID NO:40)。虚下划线表示铰链区。部分地，本公开文本提供了多肽，其包含与SEQ ID NO:40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，基本上由所述氨基酸序列组成，或由所述氨基酸序列组成。

```
  1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
 51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
101  YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151  VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201  EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK     (SEQ ID NO: 40)
```

[0247]

[0248] 本文关于G1Fc序列(SEQ ID NO:36)呈现了Fc结构域中的多种工程化突变，并且G2Fc、G3Fc和G4Fc中的类似突变可以源自它们与图4中的G1Fc的比对。由于不相等的铰链长度，基于同种型比对(图4)的类似Fc位置在SEQ ID NO:36、37、38、39和40中具有不同的氨基酸编号。还可以理解，由铰链、C_H2和C_H3区组成的免疫球蛋白序列(例如，SEQ ID NO:36、37、38、39和40)中的给定氨基酸位置将通过与当编号涵盖如在Uniprot数据库中的整个IgG1重链恒定结构域(由C_H1、铰链、C_H2和C_H3区组成)时的相同位置不同的编号来鉴定。

[0249] 本申请还提供了具有工程化或变体Fc区的抗体和Fc融合蛋白。此类抗体和Fc融合蛋白可用于例如调节效应子功能，如抗原依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。另外，所述修饰可以改善抗体和Fc融合蛋白的稳定性。通过将适当的核苷酸变化引入DNA中或通过肽合成来制备抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列变体。此类变体包括例如本文公开的抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列内的残基的缺失和/或在所述残基中插入和/或取代。进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终构建体，条件是最终构建体具有所需的特征。氨基酸变化也可以改变抗体和Fc融合蛋白的翻译后过程，如改变糖基化位点的数量或位置。

[0250] 可以通过在氨基酸序列中引入变化来产生具有降低的效应子功能的抗体和Fc融合蛋白，所述变化包括但不限于Bluestone等人描述的Ala-Ala突变(参见WO 94/28027和WO 98/47531；还参见Xu等人2000 Cell Immunol 200;16-26)。因此，在某些实施方案中，在恒定区内具有突变(包括Ala-Ala突变)的本公开文本的抗体和Fc融合蛋白可以用于降低或消除效应子功能。根据这些实施方案，抗体和Fc融合蛋白可以包含在位置234处突变为丙氨酸或在位置235处突变为丙氨酸或其组合。在一个实施方案中，所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG4框架，其中所述Ala-Ala突变将描述在位置234处从苯丙氨酸到丙氨酸的一个或多个突变和/或在位置235处从亮氨酸到丙氨酸的突变。在另一个实施方案中，所述抗体或Fc融合

蛋白包含IgG1框架,其中所述Ala-Ala突变将描述在位置234处从亮氨酸到丙氨酸的一个或多个突变和/或在位置235处从亮氨酸到丙氨酸的突变。所述抗体或Fc融合蛋白可以可替代地或另外地携带其他突变,包括CH2结构域中的点突变K322A(Hezareh等人2001J Virol.75:12161-8)。

[0251] 在一些实施方案中,可以修饰所述抗体或Fc融合蛋白以增强或抑制补体依赖性细胞毒性(CDC)。调节的CDC活性可以通过在Fc区中引入一个或多个氨基酸取代、插入或缺失来实现(参见例如美国专利号6,194,551)。可替代地或另外地,可将一个或多个半胱氨酸残基引入所述Fc区中,从而允许在此区域中形成链间二硫键。由此生成的同二聚体抗体可以具有改善或降低的内化能力和/或增加或减少的补体介导的细胞杀伤。参见Caron等人,J.ExpMed.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992),WO 99/51642,Duncan&Winter Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0252] 应理解,融合蛋白(例如,免疫球蛋白Fc融合蛋白)的不同元件能以符合所需功能性的任何方式排列。例如,BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽结构域可以位于异源结构域的C末端,或者可替代地,异源结构域可以位于BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽结构域的C末端。所述BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽结构域和所述异源结构域不必在融合蛋白中相邻,并且另外的结构域或氨基酸序列可以被包含在任一个结构域的C末端或N末端或这些结构域之间。

[0253] 例如,BMP10前肽(ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白)融合蛋白可以包含如式A-B-C中所示的氨基酸序列。所述B部分对应于BMP10前肽(ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白)多肽结构域。A部分和C部分可以独立地是零个、一个或超过一个氨基酸,并且A部分和C部分二者在存在的情况下对于B都是异源的。A部分和/或C部分可以通过接头序列附接至B部分。接头可以富含甘氨酸(例如,2-10、2-5、2-4、2-3个甘氨酸残基)或甘氨酸和脯氨酸残基,并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单一序列或苏氨酸/丝氨酸和/或甘氨酸的重复序列,例如GGG(SEQ ID NO:41)、GGGG(SEQ ID NO:42)、TGGGG(SEQ ID NO:43)、SGGGG(SEQ ID NO:44)、TGGG(SEQ ID NO:45)、SGGG(SEQ ID NO:46)或GGGGS(SEQ ID NO:47)单个序列或重复。在某些实施方案中,BMP10前肽(ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白)融合蛋白包含如式A-B-C中所示的氨基酸序列,其中A是前导(信号)序列,B由BMP10前肽(ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白)多肽结构域组成,并且C是增强体内稳定性、体内半衰期、吸收/给予、组织定位或分布、蛋白质复合物的形成和/或纯化中的一种或多种的多肽部分。在某些实施方案中,BMP10前肽(ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白)融合蛋白包含如式A-B-C中所示的氨基酸序列,其中A是TPA前导序列,B由BMP10前肽(ActRII、BMPRII、ALK1或内皮糖蛋白)受体多肽结构域组成,并且C是免疫球蛋白Fc结构域。优选的融合蛋白包含SEQ ID NO:28、29、30、31、50、54、57、58、60、63、64、66、69、71、74、76、78、80、82、84、85、87、123、131和132中的任何一个中所示的氨基酸序列。

[0254] 在某些优选的实施方案中,根据本文所述方法使用的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽是分离的复合物。如本文所用,分离的蛋白质(或蛋白质复合物)或多肽(或多肽复合物)是已经与其天然环境的组分分离的蛋白质或

多肽。在一些实施方案中，将本公开文本的多肽纯化至大于95％、96％、97％、98％或99％纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱法(例如，离子交换或反相HPLC)所测定的。用于评估抗体纯度的方法是本领域公知的[Flatman等人，(2007)J.Chromatogr.B 848:79-87]。

[0255] 在某些实施方案中，本公开文本的BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽可以通过各种本领域已知的技术产生。例如，本公开文本的多肽可以使用标准蛋白质化学技术来合成，如以下文献中所述的那些技术：Bodansky，M.Principles of Peptide Synthesis,Springer Verlag,柏林(1993)和Grant G.A.(编辑)，Synthetic Peptides:A User's Guide,W.H.Freeman and Company,纽约(1992)。另外，自动化肽合成仪是可商购的(Advanced ChemTech Model 396;Milligen/Biosearch 9600)。可替代地，本公开文本的多肽和复合物(包括其片段或变体)可以使用如本领域公知的各种表达系统[大肠杆菌(E.coli)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、杆状病毒]重组产生。在另一实施方案中，本公开文本的修饰的或未修饰的多肽可以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、胃蛋白酶或成对碱性氨基酸转化酶(PACE))消化重组产生的全长BMP10前肽多肽、ActRII多肽、BMPRII多肽、ALK1多肽和/或内皮糖蛋白多肽来产生。计算机分析(使用可商购的软件，例如MacVector、Omega、PCGene，Molecular Simulation,Inc.)可以用于鉴定蛋白质水解切割位点。

[0256] 3.编码BMP10前肽、ActRII、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白多肽的核酸

[0257] 在某些实施方案中，本公开文本提供了编码本文公开的ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽(包括其片段、功能变体和融合蛋白)的分离的和/或重组的核酸。例如，SEQ ID NO:16编码天然存在的人BMPRII前体多肽，SEQ ID NO:17编码BMPRII的加工的细胞外结构域。主题核酸可以是单链或双链的。此类核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可以用于例如制备如本文所述的ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的方法中。

[0258] 如本文所用，一种或多种分离的核酸是指已经与其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有所述核酸分子，但所述核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0259] 在某些实施方案中，编码本公开文本的ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的核酸应理解为包括SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、19、22、23、25、27、33、35、55、61、67、70、72、79、83、86、124、125、126、127、134、135、136和137中的任何一个及其变体。变体核苷酸序列包括因一个或多个核苷酸取代、添加或缺失而不同的序列(包括等位基因变体)，并且因此将包括与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、19、22、23、25、27、33、35、55、61、67、70、72、79、83、86、124、125、126、127、134、135、136和137中的任何一个中指定的核苷酸序列不同的编码序列。

[0260] 在某些实施方案中，本公开文本的ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽由分离的或重组的核酸序列编码，所述分离的或重组的核酸序列包含与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、19、22、23、25、27、33、35、55、61、67、70、72、75、79、83、86、124、125、126、127、134、135、136和137至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由所述序

列组成，或由所述序列组成。本领域普通技术人员将理解，如下核酸序列也在本公开文本的范围内，所述核酸序列包含互补于与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、19、22、23、25、27、33、35、55、61、67、70、72、79、83、86、124、125、126、127、134、135、136和137至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的序列的序列，基本上由所述序列组成，或由所述序列组成。在另一实施方案中，本公开文本的核酸序列可以与异源核苷酸序列分离、重组和/或融合，或者在DNA文库中。

[0261] 在其他实施方案中，本公开文本的核酸还包括核苷酸序列，所述核苷酸序列在严格条件下与SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、19、22、23、25、27、33、35、55、61、67、70、72、79、83、86、124、125、126、127、134、135、136和137中指定的核苷酸序列或其片段杂交。本领域普通技术人员应容易理解，促进DNA杂交的适当严格度条件可以变化。例如，可以在6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)下在约45℃下进行杂交，之后用2.0x SSC在50℃下洗涤。例如，洗涤步骤中的盐浓度可以选自在50℃下的约2.0x SSC的低严格度至在50℃下的约0.2x SSC的高严格度。另外，洗涤步骤中的温度可以从室温(约22℃)下的低严格度条件上升至约65℃下的高严格度条件。温度和盐二者都可以变化，或者温度或盐浓度可以保持恒定，同时改变另一个变量。在一个实施方案中，本公开文本提供了核酸，所述核酸在室温下在6x SSC的低严格条件下杂交，接着在室温下在2x SSC下洗涤。

[0262] 与如SEQ ID NO:7、8、12、13、16、17、19、22、23、25、27、33、35、55、61、67、70、72、79、83、86、124、125、126、127、134、135、136和137中所示的核酸在遗传密码的简并性方面不同的分离的核酸也在本公开文本的范围内。例如，许多氨基酸由超过一个三联体指定。指定相同氨基酸的密码子或同义词(例如，CAU和CAC是组氨酸的同义词)可以导致“沉默”突变，其不影响蛋白质的氨基酸序列。然而，预期在哺乳动物细胞中存在确实导致主题蛋白质的氨基酸序列变化的DNA序列多态性。本领域技术人员将理解，由于天然等位基因变异，编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸(高达约3％-5％的核苷酸)的这些变异可以存在于给定物种的个体中。任何和所有此类核苷酸变异和所得氨基酸多态性都在本公开文本的范围内。

[0263] 在某些实施方案中，本公开文本的重组核酸可以与表达构建体中的一个或多个调控核苷酸序列可操作地连接。调控核苷酸序列通常将适合于用于表达的宿主细胞。对于多种宿主细胞，本领域中已知许多类型的适当表达载体和适合的调控序列。典型地，所述一个或多个调控核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列、以及增强子或激活子序列。本公开文本考虑了如本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或结合多于一种启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体如质粒上，或者所述表达构建体可以插入染色体中。在一些实施方案中，表达载体含有可选择的标记基因以允许选择转化的宿主细胞。可选择的标记基因是本领域公知的，并且随着使用的宿主细胞而变化。

[0264] 在本公开文本的某些方面，主题核酸在包含编码ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的核苷酸序列的表达载体中提供，并且与至少一个调控序列可操作地连接。调控序列是本领域公认的，并且被选择用于指导ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白

和/或BMP10前肽多肽的表达。因此，术语调控序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示例性调控序列描述于Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,CA(1990)。例如，在与其可操作地连接时控制DNA序列表达的多种表达控制序列中的任何一种都可以用于这些载体中以表达编码ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的DNA序列。此类有用的表达控制序列包括例如SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、T7启动子(其表达由T7RNA聚合酶指导)、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区域、fd外壳蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如，Pho5)、酵母α-交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子和已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其他序列及其各种组合。应当理解，表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞和/或期望表达的蛋白质类型的选择等因素。此外，还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由所述载体编码的任何其他蛋白质如抗生素标记物的表达。

[0265] 本公开文本的重组核酸可以通过将所克隆基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或二者中表达的载体中来产生。用于产生重组ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的表达媒介物包括质粒和其他载体。例如，适合的载体包括以下类型的质粒：用于在原核细胞(如大肠杆菌)中表达的pBR322衍生的质粒、pEMBL衍生的质粒、pEX衍生的质粒、pBTac衍生的质粒和pUC衍生的质粒。

[0266] 一些哺乳动物表达载体既含有原核序列以促进载体在细菌中的增殖，又含有一个或多个在真核细胞中表达的真核转录单位。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体是适合于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的例子。将这些载体中的一些用来自细菌质粒(如pBR322)的序列修饰，以促进原核和真核细胞中的复制和药物抗性选择。可替代地，病毒如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)(pHEBo、pREP衍生的和p205)的衍生物可以用于在真核细胞中蛋白质的短暂表达。其他病毒(包括逆转录病毒)表达系统的例子可以在以下基因疗法递送系统的描述中找到。用于制备质粒和转化宿主生物的多种方法是本领域公知的。对于原核和真核细胞的其他合适的表达系统，以及一般的重组程序[Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3版,Sambrook,Fritsch和Maniatis编辑Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001]。在一些情况下，可能需要通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。此类杆状病毒表达系统的例子包括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β-gal的pBlueBac III)。

[0267] 在一个优选实施方案中，载体将被设计用于在CHO细胞中产生主题ALK4和/或ActRII多肽，如Pcmv-Script载体(Stratagene，拉荷亚，加利福尼亚州)、pcDNA4载体(Invitrogen，卡尔斯巴德，加利福尼亚州)和pCI-neo载体(Promega，麦迪逊，威斯康辛州)。清楚的是，主题基因构建体可以用于在培养物中繁殖的细胞中引起主题ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的表达，例如以产生蛋白质(包括融合蛋白或变体蛋白)以供纯化。

[0268] 本公开文本还涉及用重组基因转染的宿主细胞，所述重组基因包括主题ActRII、

BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽中的一种或多种的编码序列。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如，ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽可以在细菌细胞(如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如，使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞[例如，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系]中表达。其他适合的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0269] 因此，本公开文本还涉及产生主题ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的方法。例如，可以在适当的条件下培养用编码ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的表达载体转染的宿主细胞，以允许进行ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的表达。多肽可以分泌并从细胞和含有所述多肽的培养基的混合物中分离。可替代地，ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽可以从获得自收获且裂解的细胞的细胞质或膜级分中分离。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的适合的培养基是本领域公知的。可以使用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离主题多肽，所述技术包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳、用对ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的特定表位具特异性的抗体进行免疫亲和纯化以及用结合与ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽融合的结构域的药剂进行亲和纯化(例如，蛋白质A柱可以用于纯化ActRII-Fc、BMPRII-Fc、ALK1-Fc、内皮糖蛋白-Fc和/或BMP10前肽-Fc融合蛋白)。在一些实施方案中，所述ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0270] 在一些实施方案中，通过一系列柱色谱步骤实现纯化，包括例如以任何顺序的以下步骤中的三步或更多步：蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。ActRII-Fc、BMPRII-Fc、ALK1-Fc、内皮糖蛋白-Fc和/或BMP10前肽-Fc融合蛋白可以纯化至如通过尺寸排阻色谱测定的>90％、>95％、>96％、>98％或>99％的纯度，以及如通过SDS PAGE测定的>90％、>95％、>96％、>98％或>99％的纯度。目标纯度水平应是足以在哺乳动物系统(特别是在非人灵长类动物、啮齿动物(小鼠)和人类)中获得期望的结果的纯度水平。

[0271] 在另一个实施方案中，编码纯化前导序列(如重组ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽的所需部分的N末端处的聚(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可以允许通过使用Ni^{2+}金属树脂的亲和色谱纯化表达的融合蛋白。然后可以随后通过用肠激酶处理去除纯化前导序列，以提供纯化的ActRII、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或BMP10前肽多肽[Hochuli等人(1987)J.Chromatography 411:177；和Janknecht等人(1991)PNAS USA 88:8972]。

[0272] 制备融合基因的技术是公知的。实质上，编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接按照常规技术进行，采用平端或错端末端进行连接，进行限制酶消化以提供适当的末端，适当地填充粘性末端，进行碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接以及进行酶促连接。在另一个实施方案中，融合基因可以通过包括自动化DNA合成仪的常规技术合成。可替代地，可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增，所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补突出端，所述片段随后可以退火以产生嵌合基因序列。参见例如，Current Protocols in Molecular Biology，编辑Ausubel等人，John Wiley&Sons:1992。

[0273] 4.抗体拮抗剂

[0274] 在其他方面，本公开文本涉及BMP拮抗剂(抑制剂)，其是抗体或抗体的组合。BMP拮抗剂抗体或抗体的组合可以与例如BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和/或BMP3b或一种或多种与BMP相互作用的受体[例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和内皮糖蛋白]结合。特别地，本公开文本提供了单独地使用BMP拮抗剂抗体或BMP拮抗剂抗体的组合或者与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合使用的方法，以在有需要的受试者中实现期望的效果(例如，治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症)。

[0275] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP10的抗体。因此，在一些实施方案中，BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与BMP10结合。如本文所用，BMP10抗体(抗BMP10抗体)通常是指以足够的亲和力结合至BMP10的抗体，使得所述抗体在靶向BMP10中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗BMP10抗体与无关的非BMP10蛋白结合的程度小于所述抗体与BMP10结合的约10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或小于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中，抗BMP10抗体结合至BMP10的在来自不同物种的BMP10之间保守的表位。在某些优选实施方案中，抗BMP10抗体结合至人BMP10。在其他优选的实施方案中，抗BMP10抗体可以抑制BMP10与同源I型、II型或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)的结合，从而抑制BMP10介导的经由这些受体的信号传导(例如，Smad信号传导)。应当注意，BMP10与BMP9具有一些序列同源性，因此在一些情况下，与BMP10结合的抗体也可以结合和/或抑制BMP9。在一些实施方案中，抗BMP10抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，其与一种或多种另外的配体(例如，BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b)结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合。在一些实施方案中，BMP10抗体还与BMP9结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体的组合以及其用途，其中所述抗体的组合包含抗BMP10抗体和与例如不同的配体(例如，BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b)结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中，包含抗BMP10抗体的抗体组合还包含抗BMP9抗体。优选地，BMP10抗体与成熟BMP10结构域结合并与BMP10前肽竞争结合。

[0276] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP9的抗体。因此，在一些实施方案中，BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与BMP9结合。如本文所用，BMP9抗体(抗BMP9抗体)通常是指以足够的亲和力与BMP9结合的抗体，使得所述抗体可用作靶向BMP9的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗BMP9抗体与无关的非BMP9蛋白结合的程度小于所述抗体与BMP9结合的约10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或小于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中，抗BMP9抗体结合至BMP9的在来自不同物种的BMP9之间保守的表位。在某些优选实施方案中，抗BMP9抗体结合至人BMP9。在其他优选的实施方案中，抗BMP9抗体可以抑制BMP9与同源I型、II型或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)的结合，从而抑制BMP9介导的经由这些受体的信号传导(例如，Smad信号传导)。应当注意，BMP9与BMP10具有一些序列同源性，因此在一些情况下，与BMP9结合的抗体也可以结合和/或抑制BMP10。在一些实施方案中，抗BMP9抗体是多特异性抗体(例如，双特

异性抗体)，其与一种或多种另外的配体[例如，BMP10、BMP6、BMP5和BMP3b]结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合。在一些实施方案中，BMP9抗体还与BMP10结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体的组合以及其用途，其中所述抗体的组合包含抗BMP9抗体和与例如不同的配体(例如，BMP10、BMP6、BMP5和BMP3b)结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中，包含抗BMP9抗体的抗体组合还包含抗BMP10抗体。

[0277] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP6的抗体。因此，在一些实施方案中，BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与BMP6结合。如本文所用，BMP6抗体(抗BMP6抗体)通常是指以足够的亲和力结合至BMP6的抗体，使得所述抗体在靶向BMP6中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗BMP6抗体与无关的非BMP6蛋白结合的程度小于所述抗体与BMP6结合的约10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或小于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中，抗BMP6抗体结合至BMP6的在来自不同物种的BMP6之间保守的表位。在某些优选实施方案中，抗BMP6抗体结合至人BMP6。在其他优选的实施方案中，抗BMP6抗体可以抑制BMP6与同源I型、II型或共受体的结合，从而抑制BMP6介导的经由这些受体的信号传导(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，抗BMP6抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，其与一种或多种另外的配体[例如，BMP10、BMP9、BMP5和BMP3b]结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合。在一些实施方案中，BMP6抗体还与BMP9/BMP10结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体的组合以及其用途，其中所述抗体的组合包含抗BMP6抗体和与例如不同的配体(例如，BMP10、BMP9、BMP5和BMP3b)结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中，包含抗BMP6抗体的抗体组合还包含抗BMP10和/或BMP9抗体。

[0278] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP5的抗体。因此，在一些实施方案中，BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与BMP5结合。如本文所用，BMP5抗体(抗BMP5抗体)通常是指以足够的亲和力与BMP5结合的抗体，使得所述抗体可用作靶向BMP5的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗BMP5抗体与不相关的非BMP5蛋白的结合程度少于所述抗体与BMP5的结合的约10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或少于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或其他蛋白质间相互作用或结合亲和力测定所测定。在某些实施方案中，抗BMP5抗体与BMP5的表位结合，所述BMP5的表位在来自不同物种的BMP5中是保守的。在某些优选的实施方案中，抗BMP5抗体与人BMP5结合。在其他优选的实施方案中，抗BMP5抗体可以抑制BMP5与同源I型、II型或共受体的结合，从而抑制BMP5介导的经由这些受体的信号传导(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，抗BMP5抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，其与一种或多种另外的配体[例如，BMP10、BMP9、BMP6和BMP3b]结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合。在一些实施方案中，BMP5抗体还与BMP9和/或BMP10结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体的组合以及其用途，其中所述抗体的组合包含抗BMP5抗体和与例如不同的配体(例如，BMP10、BMP9、BMP6和BMP3b)结合和/或与一种或多种I型、II

型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中,包含抗BMP5抗体的抗体组合还包含抗BMP10和/或BMP9抗体。

[0279] 在某些方面,本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMP3b的抗体。因此,在一些实施方案中,BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与BMP3b结合。如本文所用,BMP3b抗体(抗BMP3b抗体)通常是指以足够的亲和力与BMP3b结合的抗体,使得所述抗体可用作靶向BMP3b的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗BMP3b抗体与不相关的非BMP3b蛋白的结合程度少于所述抗体与BMP3b的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或其他蛋白质间相互作用或结合亲和力测定所测定。在某些实施方案中,抗BMP3b抗体与BMP3b的表位结合,所述BMP3b的表位在来自不同物种的BMP3b中是保守的。在某些优选的实施方案中,抗BMP3b抗体与人BMP5结合。在其他优选的实施方案中,抗BMP3b抗体可以抑制BMP3b与同源I型、II型或共受体的结合,从而抑制BMP3b介导的经由这些受体的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,抗BMP3b抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),其与一种或多种另外的配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5]结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合。在一些实施方案中,BMP3b抗体还与BMP9和/或BMP10结合。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗BMP3b抗体和与例如不同的配体(例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5)结合和/或与一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中,包含抗BMP3b抗体的抗体组合还包含抗BMP10和/或BMP9抗体。

[0280] 在其他方面,本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制ActRII受体(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的抗体。因此,在一些实施方案中,BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与ActRIIA结合,但不与ActRIIB结合或基本上不与ActRIIB结合(例如,以大于1x 10^{-7}M的K_D与ActRIIB结合或具有相对适度的结合,例如约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在其他实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ActRIIB,但是不结合或基本上不结合至ActRIIA(例如,以大于1x 10^{-7}M的K_D结合至ActRIIA,或者具有相对较低的结合,例如约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在仍其他实施方案中,ActRII拮抗剂抗体或抗体组合结合至至少ActRIIA和ActRIIB。如本文所用,ActRII抗体(抗ActRII抗体)通常是指以足够的亲和力结合至ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的抗体,使得所述抗体在靶向ActRII中可用作诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗ActRII抗体与无关的非ActRII蛋白结合的程度小于所述抗体与ActRII结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量的。在某些实施方案中,抗ActRII抗体结合至ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的在来自不同物种的ActRII之间保守的表位。在某些优选实施方案中,抗ActRII抗体结合至人ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)。在其他优选的实施方案中,抗ActRII抗体可以抑制一种或多种配体(例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5)与ActRII(例如ActRIIA和/或ActRIIB)的结合。应注意,ActRIIA与ActRIIB具有序列同源性,并且因此在一些情况下,结合至ActRIIA的抗体也可以结合至和/或抑制ActRIIB,反之亦然。在一些实施方案中,抗ActRII抗体是与ActRII(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)和一种或多种配体(例如,BMP10、

BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b)结合的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一些实施方案中,抗ActRII抗体是结合至ActRIIA和ActRIIB的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合以及其用途,其中所述抗体组合包含至少抗ActRIIA抗体和至少ActRIIB抗体。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗ActRIIA抗体和与例如一种或多种配体(例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5)、BMPRII、ALK1和/或内皮糖蛋白结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗ActRIIB抗体和与例如一种或多种配体(例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5)、BMPRII、ALK1和/或内皮糖蛋白结合的一种或多种另外的抗体。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗ActRIIA抗体、抗ActRIIB抗体和与例如一种或多种配体(例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5)、BMPRII、ALK1和/或内皮糖蛋白结合的至少一种或多种另外的抗体。

[0281] 在其他方面,本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制ALK1的抗体。因此,在一些实施方案中,BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与ALK1结合。如本文所用,ALK1抗体(抗ALK1抗体)通常是指以足够的亲和力与ALK1结合的抗体,使得所述抗体可用作靶向ALK1的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗ALK1抗体与不相关的非ALK1蛋白的结合程度少于所述抗体与ALK1的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或其他蛋白质间相互作用或结合亲和力测定所测定。在某些实施方案中,抗ALK1抗体与ALK1的表位结合,所述ALK1的表位在来自不同物种的ALK1中是保守的。在某些优选的实施方案中,抗ALK1抗体与人ALK1结合。在其他优选的实施方案中,抗ALK1抗体可以抑制一种或多种配体(例如,BMP10和BMP9)与ALK1的结合。在一些实施方案中,抗ALK1抗体是与ALK1和一种或多种配体(例如,BMP9和BMP10)、BMPRII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或内皮糖蛋白结合的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗ALK1抗体和与例如一种或多种配体(例如,BMP9和BMP10)、BMPRII、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或内皮糖蛋白结合的一种或多种另外的抗体。

[0282] 在其他方面,本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制BMPRII的抗体。因此,在一些实施方案中,BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与BMPRII结合。如本文所用,BMPRII抗体(抗BMPRII抗体)通常是指以足够的亲和力与BMPRII结合的抗体,使得所述抗体可用作靶向BMPRII的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗BMPRII抗体与不相关的非BMPRII蛋白的结合程度少于所述抗体与BMPRII的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或其他蛋白质间相互作用或结合亲和力测定所测定。在某些实施方案中,抗BMPRII抗体与BMPRII的表位结合,所述BMPRII的表位在来自不同物种的BMPRII中是保守的。在某些优选的实施方案中,抗BMPRII抗体与人BMPRII结合。在其他优选的实施方案中,抗BMPRII抗体可以抑制一种或多种配体(例如,BMP10和BMP9)与BMPRII的结合。在一些实施方案中,抗BMPRII抗体是与BMPRII和一种或多种配体(例如,BMP9和BMP10)、ALK1、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或内皮糖蛋白结合的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗BMPRII抗体和与例如一种或多种

配体(例如,BMP9和BMP10)、ALK1、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或内皮糖蛋白结合的一种或多种另外的抗体。

[0283] 在其他方面,本公开文本的BMP拮抗剂抗体或抗体的组合是至少抑制内皮糖蛋白的抗体。因此,在一些实施方案中,BMP拮抗剂抗体或抗体的组合至少与内皮糖蛋白结合。如本文所用,内皮糖蛋白抗体(抗内皮糖蛋白抗体)通常是指以足够的亲和力与内皮糖蛋白结合的抗体,使得所述抗体可用作靶向内皮糖蛋白的诊断和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗内皮糖蛋白抗体与不相关的非内皮糖蛋白蛋白质的结合程度少于所述抗体与内皮糖蛋白的结合的约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或少于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或其他蛋白质间相互作用或结合亲和力测定所测定。在某些实施方案中,抗内皮糖蛋白抗体与内皮糖蛋白的表位结合,所述内皮糖蛋白的表位在来自不同物种的内皮糖蛋白中是保守的。在某些优选的实施方案中,抗内皮糖蛋白抗体与人内皮糖蛋白结合。在其他优选的实施方案中,抗内皮糖蛋白抗体可以抑制一种或多种配体(例如,BMP10和BMP9)与内皮糖蛋白的结合。在一些实施方案中,抗内皮糖蛋白抗体是与内皮糖蛋白和一种或多种配体(例如,BMP9和BMP10)、ALK1、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或BMPRII结合的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体的组合以及其用途,其中所述抗体的组合包含抗内皮糖蛋白抗体和与例如一种或多种配体(例如,BMP9和BMP10)、ALK1、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或BMPRII结合的一种或多种另外的抗体。

[0284] 术语抗体在本文中以最广泛的含义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要其展现出所需的抗原结合活性即可。抗体片段是指除了完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和从抗体片段形成的多特异性抗体。参见例如,Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134;Plückthun,在ThePharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,纽约),第269-315页(1994);WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894、5,587,458和5,869,046。本文所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,本公开文本的抗体包含附接至所述抗体并且能够被检测到的标记(例如,标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。在优选实施方案中,本公开文本的抗体是分离的抗体。

[0285] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448。三抗体和四抗体也描述于以下文献中:Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134。

[0286] 单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或一部分或者轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。参见例如,美国专利号6,248,516。

[0287] 抗体片段可以通过多种技术来制备,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(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。

[0288] 本文中的抗体可以属于任何类别。抗体的类别是指其重链所具有的恒定结构域或

恒定区的类型。抗体有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的若干个类别可以被进一步分为子类别(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域被称为α、δ、ε、γ和μ。

[0289] 通常,用于本文所公开方法中的抗体优选地以高结合亲和力特异性结合至其靶抗原。亲和力可以表示为K_D值并且反映固有的结合亲和力(例如,具有最小化的亲合力效应)。通常,结合亲和力是在体外(在无细胞环境中或细胞相关环境中)测量。本领域已知的许多测定(包括本文所公开的那些)中的任一种可以用于获得结合亲和力测量值,包括例如表面等离子体共振(Biacore™测定)、放射性标记的抗原结合测定(RIA)和ELISA。在一些实施方案中,本公开文本的抗体与其靶抗原[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白]以至少$1x\ 10^{-7}$或更强、$1x\ 10^{-8}$或更强、$1x\ 10^{-9}$或更强、$1x\ 10^{-10}$或更强、$1x\ 10^{-11}$或更强、$1x\ 10^{-12}$或更强、$1x\ 10^{-13}$或更强或$1x\ 10^{-14}$或更强的K_D结合。

[0290] 在某些实施方案中,K_D是通过用所关注抗体的Fab形式及其靶抗原进行的RIA来测量,如以下测定所述。Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过以下方式来测量:在一个滴定系列的未标记抗原的存在下用最低浓度的放射性标记的抗原(例如,^{125}I标记的)平衡Fab,然后用抗Fab抗体包衣的板捕获所结合抗原[参见例如,Chen等人(1999)J.Mol.Biol.293:865-881]。为了建立用于测定的条件,用捕获抗Fab抗体(例如,来自Cappel Labs)包衣多孔板(例如,来自Thermo Scientific的MICROTITER®)(例如,过夜),并且之后用牛血清白蛋白优选地在室温(例如,大约23℃)下封闭。在非吸附板中,将放射性标记的抗原与所关注Fab的连续稀释液混合[例如,与对抗VEGF抗体Fab-12的评估一致,在Presta等人,(1997)Cancer Res.57:4593-4599]。然后将所关注Fab优选地孵育过夜,但是孵育可以持续较长时间段(例如,约65小时)以确保达到平衡。之后,将混合物转移至捕获板以供优选地在室温下孵育约1小时。然后去除溶液,并且优选地用聚山梨醇酯20和PBS混合物将板洗涤若干次。在板干燥后,添加闪烁体(例如,来自Packard的MICROSCINT®),并且在γ计数器(例如,来自Packard的TOPCOUNT®)上对板计数。

[0291] 根据另一个实施方案,KD是使用表面等离子体共振测定使用例如BIACORE®2000或BIACORE®3000(Biacore,Inc.,皮斯卡塔韦,新泽西州)用固定化抗原CM5芯片以约10个反应单位(RU)来测量。简单来说,根据供应商的说明书,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)激活羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,Biacore,Inc.)。例如,可以用10mM乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释至5μg/ml(约0.2μM),之后以5μl/分钟的流速注射以达到大约10个反应单位(RU)的偶联蛋白。在抗原注射后,注射1M乙醇胺以封闭未反应基团。对于动力学测量,在含有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20®)表面活性剂的PBS(PBST)中以大约25μl/min的流速注射Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用例如简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_D)计算为比率k_{off}/k_{on}[参见例如,Chen等人,(1999)J.Mol.Biol.293:865-881]。如果通过上述表面等离子体共振测定测得缔合速率超过例如$10^6M^{-1}s^{-1}$,则可以通过使用萦

光淬灭技术测定缔合速率,所述萦光淬灭技术测量在PBS中在浓度递增的抗原存在下,20nM抗抗原抗体(Fab形式)的萦光发射强度(例如,激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或降低,如在具有搅拌比色皿的光谱仪如配备停流附件(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO®分光光度计(ThermoSpectronic)中所测量的。

[0292] 人BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白的核酸和氨基酸序列是本领域公知的,因此技术人员可以根据本领域的知识和本文提供的传授常规地制备用于根据本公开文本使用的抗体拮抗剂。

[0293] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体是嵌合抗体。嵌合抗体是指如下抗体:其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同的来源或物种。某些嵌合抗体描述于例如以下文献中:美国专利号4,816,567;和Morrison等人,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855。在一些实施方案中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(如猴子)的可变区)和人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体是"类别转换"抗体,其中类别或子类别已经从亲代抗体的类别或子类别变化。通常,嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0294] 在某些实施方案中,本文所提供的嵌合抗体是人源化抗体。人源化抗体是指如下嵌合抗体,其包含来自非人超变区(HVR)的氨基酸残基和来自人框架区(FR)的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个(并且通常两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可以包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人抗体)的"人源化形式"是指已经经历人源化的抗体。

[0295] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619-1633中,并且进一步描述于例如以下文献中:Riechmann等人,(1988)Nature 332:323-329;Queen等人(1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA86:10029-10033;美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,(2005)Methods 36:25-34[描述SDR(a-CDR)移植];Padlan,Mol.Immunol.(1991)28:489-498(描述"表面重修");Dall'Acqua等人(2005)Methods 36:43-60(描述"FR改组");Osbourn等人(2005)Methods 36:61-68;和Klimka等人Br.J.Cancer(2000)83:252-260(描述用于FR改组的"导向选择"方法)。

[0296] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用"最佳拟合"法选择的框架区[参见例如,Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296];衍生自特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区[参见例如,Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;和Presta等人(1993)J.Immunol.,151:2623];人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区[参见例如,Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619-1633];和衍生自筛选FR文库的框架区[参见例如,Baca等人,(1997)J.Biol.Chem.272:10678-10684;和Rosok等人,(1996)J.Biol.Chem.271:22611-22618]。

[0297] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的多种技术来产生。人抗体总体上描述于以下文献中:van Dijk和vande Winkel(2001)Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74和Lonberg(2008)Curr.Opin.Immunol.20:450-459。

[0298] 人抗体可以通过将免疫原[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白]给予至转基因动物来制备,所述转基因动物已被修饰以响应抗原攻击产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其置换内源免疫球蛋白基因座,或者其存在于染色体外或随机整合至动物染色体中。在此类转基因动物中,通常已经使内源性免疫球蛋白基因座失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见例如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-M MOUSE®技术);和美国专利申请公开号2007/0061900(描述VelociMouse®技术)。来自由此类动物产生的完整抗体的人可变区可以例如通过与不同的人恒定区组合来进行进一步修饰。

[0299] 本文所提供的人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法来制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系[参见例如,Kozbor J.Immunol.,(1984)133:3001;Brodeur等人(1987)Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页,Marcel Dekker,Inc.,纽约;和Boerner等人(1991)J.Immunol.,147:86]。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于以下文献中:Li等人,(2006)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562。其他方法包括描述于例如以下文献中的那些:美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体);和Ni,Xiandai Mianyixue(2006)26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)。人杂交瘤技术(三源杂交瘤技术)也描述于以下文献中:Vollmers和Brandlein(2005)Histol.Histopathol.,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein(2005)Methods Find Exp.Clin.Pharmacol.,27(3):185-91。

[0300] 本文所提供的人抗体还可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生。然后可以将此类可变结构域序列与所需的人恒定结构域组合。用于从抗体文库中选择人抗体的技术描述于本文中。

[0301] 例如,本公开文本的抗体可以通过针对具有所需的一种或多种活性的抗体筛选组合文库来分离。本领域已知多种用于产生噬菌体展示文库和针对具有所需结合特征的抗体筛选此类文库的方法。此类方法综述于例如以下文献中:Hoogenboom等人(2001)在Methods in Molecular Biology 178:1-37,O'Brien等人编辑,Human Press,托托华,新泽西州,并且进一步描述于例如以下文献中:McCafferty等人(1991)Nature 348:552-554;Clackson等人,(1991)Nature 352:624-628;Marks等人(1992)J.Mol.Biol.222:581-597;Marks和Bradbury(2003)在Methods in Molecular Biology 248:161-175,Lo编辑,Human Press,托托华,新泽西州;Sidhu等人(2004)J.Mol.Biol.338(2):299-310;Lee等人(2004)J.Mol.Biol.340(5):1073-1093;Fellouse(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472;和Lee等人(2004)J.Immunol.Methods284(1-2):119-132。

[0302] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆VH和VL基因库,并在噬菌体文库中随机重组,随后可以针对抗原结合噬菌体筛选所述噬菌体文库,如Winter等人(1994)Ann.Rev.Immunol.,12:433-455中所述。噬菌体通常展示作为单链Fv(scFv)片

段或作为Fab片段的抗体片段。来自免疫源的文库在不需要构建杂交瘤的情况下提供针对免疫原[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白]的高亲和力抗体。可替代地,可以(例如,从人)克隆幼稚库以在不进行任何免疫的情况下提供针对广泛范围的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源,如Griffiths等人(1993)EMBO J,12:725-734所述。最后,还可以通过以下方式合成地制备幼稚文库:从干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高可变CDR3区域并在体外完成重排,如Hoogenboom和Winter(1992)J.Mol.Biol.,227:381-388所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开案包括例如:美国专利号5,750,373以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0303] 在某些实施方案中,本文所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(通常是单克隆抗体)对一种或多种(例如,2、3、4、5、6种或更多种)抗原上的至少两个不同表位(例如,2、3、4、5、6个或更多个)具有结合特异性。

[0304] 本文中还包括具有三个或更多个功能抗原结合位点的工程化抗体(包括“章鱼抗体”)(参见例如,US 2006/0025576A1)。

[0305] 在某些实施方案中,本文所公开的抗体是单克隆抗体。单克隆抗体是指从基本上同质的抗体群获得的抗体,即构成所述群的单独抗体是相同的和/或结合相同表位,例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的产生期间出现的可能的变体抗体除外,此类变体通常以少量存在。与通常包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个表位。因此,修饰语“单克隆”指示抗体的特征为从基本上同质的抗体群获得,并且不应视为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,要根据本发明方法使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,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含有人免疫球蛋白基因座的全部或部分的转基因动物的方法,此类方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法描述于本文中。

[0306] 例如,通过使用衍生自BMP10的免疫原,可以通过标准方案制备抗蛋白/抗肽抗血清或单克隆抗体[参见例如Antibodies:A Laboratory Manual(1988)Harlow和Lane编辑,Cold Spring Harbor Press]。可以用免疫原形式的BMP10多肽、能够引发抗体应答的抗原片段或融合蛋白免疫哺乳动物,如小鼠、仓鼠或兔子。用于向蛋白质或肽赋予免疫原性的技术包括缀合至载体或本领域公知的其他技术。可以在佐剂的存在下给予BMP10多肽的免疫原部分。可以通过检测血浆或血清中的抗体效价来监测免疫进程。能以免疫原作为抗原,使用标准ELISA或其他免疫测定评估抗体产生水平和/或结合亲和力水平。

[0307] 在用BMP10的抗原制剂免疫动物后,可以获得抗血清,并且如果需要的话,可以从血清分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,可以从经免疫动物收获产生抗体的细胞(淋巴细胞)并通过标准体细胞融合程序与永生细胞(如骨髓瘤细胞)融合,以产生杂交瘤细胞。此类技术是本领域公知的,并且包括例如杂交瘤技术[参见例如,Kohler和Milstein(1975)Nature,256:495-497]、人B细胞杂交瘤技术[参见例如,Kozbar等人(1983)Immunology Today,4:72]和用于产生人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术[Cole等人(1985)MonoclonalAntibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.第77-96页]。可以通过免疫化学筛选杂交瘤细胞以用于产生与BMP10多肽特异性地反应的抗体,和从包含此类杂交

瘤细胞的培养物分离的单克隆抗体。

[0308] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文所提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述人Fc区序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,取代、缺失和/或添加)。

[0309] 例如,本公开文本考虑了如下抗体变体,其具有一些而非全部效应子功能,这使得所述抗体变体成为多种应用的期望的候选者,在所述应用中抗体的体内半衰期是重要的,但是对于所述应用,某些效应子功能[例如,补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)]是不需要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少FcγR结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达FcγRIII,而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。造血细胞上的FcR表达概述于例如以下文献中:Ravetch和Kinet(1991)Annu.Rev.Immunol.9:457-492。用于评估所关注分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述于以下文献中:美国专利号5,500,362;Hellstrom,I.等人(1986)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063;Hellstrom,I等人(1985)Proc.Nat'lAcad.Sci.USA 82:1499-1502;美国专利号5,821,337;和Bruggemann,M.等人(1987)J.Exp.Med.166:1351-1361。可替代地,可以采用非放射性测定方法(例如,ACTI™,用于流式细胞术的非放射性细胞毒性测定;CellTechnology,Inc.,山景城,加利福尼亚州;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定,Promega,麦迪逊,威斯康辛州)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可替代地,或另外地,所关注分子的ADCC活性可以在体内、例如在动物模型中评估,所述动物模型是如Clynes等人(1998)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656中所披露的动物模型。还可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,并且因此缺少CDC活性[参见例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA]。为了评估补体激活,可以进行CDC测定[参见例如,Gazzano-Santoro等人(1996)J.Immunol.Methods 202:163;Cragg,M.S.等人(2003)Blood101:1045-1052;以及Cragg,M.S和M.J.Glennie(2004)Blood 103:2738-2743]。还可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除率/半衰期测定[参见例如,Petkova,S.B.等人(2006)Int.Immunol.18(12):1759-1769]。

[0310] 本公开文本的具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297的至丙氨酸的取代的所谓"DANA"Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0311] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化的抗体,例如"thioMAb",其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中,被取代的残基存在于抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,由此将反应性硫醇基定位于抗体的可及位点处,并且可以用于将抗体缀合至其他部分,如药物部分或接头-药物部分,以产生免疫缀合物,如本文中进一步所述。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸取代以下残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。

半胱氨酸工程化的抗体可以如例如以下文献中所述来产生:美国专利号7,521,541。

[0312] 另外,用于筛选抗体以鉴定期望的抗体的技术可能影响所获得抗体的特性。例如,如果要将抗体用于结合溶液中的抗原,可能需要测试溶液结合。多种不同的技术可用于测试抗体与抗原之间的相互作用,以鉴定特别期望的抗体。此类技术包括ELISA、表面等离子体共振结合测定(例如,Biacore™结合测定,Biacore AB,乌普萨拉,瑞典)、夹心式测定(例如,顺磁性珠粒系统,IGEN International,Inc.,盖瑟斯堡,马里兰州)、蛋白质印迹、免疫沉淀测定和免疫组织化学。

[0313] 在某些实施方案中,考虑了本文所提供的抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗体和/或结合多肽的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体可以通过将适当修饰引入编码抗体和/或结合多肽的核苷酸序列中或者通过肽合成来制备。此类修饰包括例如从抗体和/或结合多肽的氨基酸序列缺失、和/或插入所述氨基酸序列中、和/或取代所述氨基酸序列内的残基。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终构建体,条件是最终构建体具有所需的特征,例如结合靶标(结合BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRII(ActRIIA和/或ActRIIB)、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)。

[0314] 可以在HVR中进行改变(例如,取代),以例如改善抗体亲和力。此类改变可以在HVR“热点”(即在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基)(参见例如,Chowdhury(2008)Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或SDR(a-CDR)中进行,并且测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并从所述二级文库中重新选择进行的亲和力成熟已经描述于本领域中[参见例如,Hoogenboom等人,在Methods inMolecular Biology 178:1-37,O'Brien等人编辑,Human Press,托托华,新泽西州,(2001)]。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法中的任何一种(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸指导的诱变),将多样性引入选择进行成熟的可变基因中。然后建立二级文库。然后筛选所述文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指导的方法,其中随机化若干个HVR残基(例如,一次4-6个残基)。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定抗原结合中所涉及的HVR残基。特别地,通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0315] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR中,只要此类改变不显著降低抗体结合至抗原的能力即可。例如,不显著降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文所提供的保守取代)可以在HVR中进行。此类改变可以位于HVR“热点”或SDR的外部。在上文所提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或者不发生改变,或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0316] 鉴定抗体和/或结合多肽中可以被靶向用于诱变的残基或区域的有用方法被称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所述。在这种方法中,鉴定残基或靶残基组(例如,带电荷的残基,如arg、asp、his、lys和glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)置换以确定抗体或结合多肽与抗原的相互作用是否受影响。可以在氨基酸位置引入进一步的取代,证明对初始取代的功能敏感性。可替代地,或另外地,抗原-抗体复合物的晶体结构可以用于鉴定抗体与抗原之间的接触点。可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基作为取代候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的性质。

[0317] 氨基酸序列插入物包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽范围内的氨基末端和/或羧基末端融合物,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入物的例子包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如,对于ADEPT)或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0318] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体和/或结合多肽可以进一步进行修饰以含有本领域已知并且容易获得的其他非蛋白质性部分。适于衍生化抗体和/或结合多肽的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚1,3-二氧戊环、聚1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇(propropylene glycol)均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而可以在制备中具有优势。所述聚合物可以具有任何分子量,并且可以有支链或无支链。附接至抗体和/或结合多肽的聚合物的数目可以变化,并且如果附接超过一种聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于包括但不限于以下的考虑因素来确定:要改善的抗体和/或结合多肽的特定特性或功能、抗体衍生物和/或结合多肽衍生物是否将要用于在确定条件下的疗法中。

[0319] 5.小分子拮抗剂

[0320] 在其他方面,本公开文本涉及BMP拮抗剂(抑制剂),其是小分子或小分子的组合。BMP拮抗剂小分子可以抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]和/或一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或3)。特别地,本公开文本提供了单独地使用BMP拮抗剂小分子或BMP拮抗剂小分子的组合或者与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合使用的方法,以在有需要的受试者中实现期望的效果(例如,治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症)。

[0321] 在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制BMP10的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制BMP10的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制BMP9的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制BMP9的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP6、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制BMP6的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制BMP6的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制BMP5的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制BMP5的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制BMP3b的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制BMP3b

的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6和BMP5]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制ActRIIA和/或ActRIIB的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制ActRIIA和/或ActRIIB的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制BMPRII的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制BMPRII的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、ALK1、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制ALK1的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制ALK1的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、内皮糖蛋白和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制内皮糖蛋白的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制内皮糖蛋白的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和/或一种或多种Smad(例如,Smad 2和3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制一种或多种Smad(例如,Smad 2和/或3)的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制Smad的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和/或内皮糖蛋白。

[0322] 小分子拮抗剂可以是直接或间接抑制剂。例如,间接的小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可以抑制至少一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和ALK)、一种或多种共受体(内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或3)的表达(例如,转录、翻译、细胞分泌或其组合)可替代地,直接的小分子BMP拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可以直接地与例如一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和ALK)、一种或多种共受体(内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或3)中的一种或多种结合。可以根据本文所公开的方法使用一种或多种间接小分子拮抗剂与一种或多种直接小分子拮抗剂的组合。

[0323] 本公开文本的结合有机小分子拮抗剂可以使用已知方法来鉴定和化学合成(参见例如,PCT公开号WO 00/00823和WO 00/39585)。通常,本公开文本的小分子拮抗剂的大小通常低于约2000道尔顿,可替代地大小低于约1500、750、500、250或200道尔顿,其中此类有机小分子能够优选地特异性结合至如本文所述的多肽。使用公知技术不经过度实验即可鉴定此类小分子拮抗剂。就此而言,应注意,针对能够结合至多肽靶标的分子筛选有机小分子文库的技术是本领域公知的(参见例如,国际专利公开号WO 00/00823和WO 00/39585)。

[0324] 本公开文本的结合有机小分子可以是例如醛、酮、肟、腙、缩氨基脲、卡巴肼、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的肼、酰肼、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、硫代缩酮、缩醛、硫代缩醛、芳基卤、芳基磺酸酯、烷基卤、烷基磺酸酯、芳

香族化合物、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、磺酰胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、磺酰氯、重氮化合物和酰基氯。

[0325] 6.核苷酸拮抗剂

[0326] 在其他方面，本公开文本涉及BMP拮抗剂(抑制剂)，其是多核苷酸或多核苷酸的组合。BMP拮抗剂多核苷酸可以抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。特别地，本公开文本提供了单独地使用BMP拮抗剂多核苷酸或BMP拮抗剂多核苷酸的组合或者与一种或多种其他支持疗法和/或活性剂组合使用的方法，以在有需要的受试者中实现期望的效果(例如，治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症)。

[0327] 在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制BMP10的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制BMP10的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制BMP9的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制BMP9的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制BMP6的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制BMP6的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP9、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制BMP5的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制BMP5的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP9、BMP6和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制BMP3b的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制BMP3b的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP9、BMP6和BMP5]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制ActRIIA和/或ActRIIB的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制ActRIIA和/或ActRIIB的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如，Smad 2和/或3)。在一些实施方案中，BMP拮抗剂是至少抑制BMPRII的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中，抑制BMPRII的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如，BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK1和内皮糖蛋白)和/或一种

或多种下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制ALK1的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制ALK1的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和内皮糖蛋白)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad 2和/或3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制内皮糖蛋白的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制内皮糖蛋白的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]、一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII和ALK1)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad2和/或3)。在一些实施方案中,BMP拮抗剂是至少抑制一种或多种Smad(例如,Smad 2和/或3)的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合。在一些实施方案中,抑制一种或多种Smad的多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合还抑制一种或多种配体[例如,BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b]和/或一种或多种I型、II型和/或共受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1和内皮糖蛋白)。

[0328] 本公开文本的多核苷酸拮抗剂可以是反义核酸、RNAi分子[例如,小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)]、适体和/或核酶。人BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad(例如,Smad 2和3)的核酸和氨基酸序列是本领域已知的,因此技术人员可以基于本领域的知识和本文提供的传授常规地制备用于根据本公开文本的方法使用的多核苷酸拮抗剂。

[0329] 例如,反义技术可以用于通过反义DNA或RNA或者通过三螺旋形成来控制基因表达。反义技术论述于例如以下文献中:Okano(1991)J.Neurochem.56:560;Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRCPress,博卡拉顿,佛罗里达州(1988)。三螺旋形成论述于例如以下文献中:Cooney等人(1988)Science 241:456;和Dervan等人,(1991)Science 251:1300。所述方法是基于多核苷酸与互补DNA或RNA的结合。在一些实施方案中,反义核酸包含与所需基因的RNA转录物的至少一部分互补的单链RNA或DNA序列。然而,虽然绝对互补性是优选的,但是并不需要。

[0330] 本文中所提及的"与RNA的至少一部分互补的"序列意指与RNA具有足够互补性,从而能够与所述RNA杂交形成稳定双链体的序列;在本文所公开的基因的双链反义核酸的情况下,可以因此测试双链体DNA的单链,或者可以测定三链体形成。杂交的能力将取决于反义核酸的互补性程度和长度二者。通常,杂交核酸越大,其可以含有的与RNA的碱基错配越多,并且仍然形成稳定的双链体(或如所述情况可以是三链体)。本领域技术人员可以通过使用标准程序确定可耐受的错配程度,以确定所杂交复合物的解链温度。

[0331] 与信使的5'端(例如,直至并且包括AUG起始密码子的5'非翻译序列)互补的多核苷酸应最有效地抑制翻译。然而,已经显示与mRNA的3'非翻译序列互补的序列也有效抑制mRNA的翻译[参见例如,Wagner,R.,(1994)Nature 372:333-335]。因此,与本公开文本的基因的5'或3'非翻译非编码区互补的寡核苷酸可以在反义方法中用于抑制内源mRNA的翻译。与mRNA的5'非翻译区互补的多核苷酸应包括AUG起始密码子的补体。与mRNA编码区互补的反义多核苷酸是较不有效的翻译抑制剂,但是可以根据本公开文本的方法来使用。不论是被设计为与本公开文本的mRNA的5'非翻译区、3'非翻译区还是编码区杂交,反义核酸的长

度应是至少6个核苷酸，并且优选地是长度在6至约50个核苷酸范围内的寡核苷酸。在具体方面中，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。

[0332] 在一个实施方案中，本公开文本的反义核酸是通过从外源序列转录而在细胞内产生。例如，转录载体或其部分，从而产生本公开文本的基因的反义核酸(RNA)。这种载体将含有编码所需反义核酸的序列。这种载体可以保持游离型或变为染色体整合的，只要其可以被转录以产生所需的反义RNA即可。此类载体可以通过本领域的重组DNA技术方法标准来构建。载体可以是用于在脊椎动物细胞中复制和表达的质粒、病毒或本领域已知的其他载体。编码本公开文本的所需基因的序列或其片段的表达可以通过本领域已知作用于脊椎动物(优选地人)细胞中的任何启动子来进行。此类启动子可以是诱导型或组成型的。此类启动子包括但不限于SV40早期启动子区[参见例如，Benoist和Chambon(1981)Nature 29:304-310]、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中所含的启动子[参见例如，Yamamoto等人(1980)Cell 22:787-797]、疱疹胸苷启动子[参见例如，Wagner等人(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445]和金属硫蛋白基因的调控序列[参见例如，Brinster等人(1982)Nature 296:39-42]。

[0333] 在一些实施方案中，多核苷酸拮抗剂是靶向一个或多个基因的表达的干扰RNA或RNAi分子。RNAi是指干扰所靶向的mRNA的表达的RNA的表达。具体来说，RNAi通过经siRNA(小干扰RNA)与特定mRNA相互作用使所靶向基因沉默。然后靶向ds RNA复合物以供细胞降解。siRNA分子是长度为10至50个核苷酸的双链RNA双链体，其干扰足够互补(例如，与所述基因具有至少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。

[0334] 其他RNAi分子包括短发夹RNA(shRNA)；以及短干扰发夹和微小RNA(miRNA)。shRNA分子含有来自靶基因的通过环连接的有义和反义序列。将shRNA从核转运至胞质中，并且其与mRNA一起降解。Pol III或U6启动子可以用于表达RNA以供进行RNAi。Paddison等人[Genes&Dev.(2002)16:948-958,2002]已经使用折叠成发夹的小RNA分子作为实现RNAi的手段。因此，此类短发夹RNA(shRNA)分子也有利地用于本文所述的方法中。功能shRNA的茎和环的长度是变化的；在不影响沉默活性的情况下，茎长度可以在约25至约30nt范围内的任何位置，并且环大小可以介于4至约25nt范围内。虽然不希望受任何特定理论的束缚，但是相信，这些shRNA与DICERRNA酶的双链RNA(dsRNA)产物相似，并且在任何事件中，具有抑制特定基因表达的相同能力。shRNA可以从慢病毒载体表达。miRNA是长度为约10至70个核苷酸的单链RNA，其首先转录为特征为“茎-环”结构的前miRNA，并且随后在通过RISC进一步加工后被加工成成熟miRNA。

[0335] 介导RNAi的分子(包括但不限于siRNA)可以在体外通过以下方式产生：通过化学合成(Hohjoh,FEBS Lett 521:195-199,2002)、dsRNA的水解(Yang等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947,2002)、通过使用T7RNA聚合酶的体外转录(Donzeet等人,Nucleic Acids Res 30:e46,2002;Yu等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052,2002)和通过使用诸如大肠杆菌RNA酶III等核酸酶水解双链RNA(Yang等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947,2002)。

[0336] 根据另一个方面，本公开文本提供了多核苷酸拮抗剂，包括但不限于诱饵DNA、双

链DNA、单链DNA、复合DNA、包封DNA、病毒DNA、质粒DNA、裸RNA、包封RNA、病毒RNA、双链RNA、能够产生RNA干扰的分子或其组合。

[0337] 在一些实施方案中，本公开文本的多核苷酸拮抗剂是适体。适体是核酸分子(包括双链DNA和单链RNA分子)，其结合并形成与靶分子特异性地结合的三级结构，所述靶分子为如BMP10、BMP9、BMP6、BMP5、BMP3b、ActRIIA、ActRIIB、BMPRII、ALK1、内皮糖蛋白和Smad(例如，Smad 2和3)。适体的产生和治疗用途是本领域中充分确立的。参见例如，美国专利号5,475,096。关于适体的其他信息可见于美国专利申请公开号20060148748。核酸适体是使用本领域已知的方法来选择，例如通过指数富集配体系统进化(SELEX)法来选择。SELEX是用于与靶分子具有高特异性结合的核酸分子的体外进化的方法，如例如以下文献中所述：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。另一种鉴定适体的筛选方法描述于以下文献中：美国专利号5,270,163。SELEX法是基于核酸形成多种二维和三维结构的能力，以及在核苷酸单体内充当配体可获得的化学通用性(与实际上任何化学化合物(无论是单体还是聚合物，包括其他核酸分子和多肽)形成特异性结合对)。任何大小或组成的分子都可以用作靶标。SELEX方法涉及从候选寡核苷酸的混合物中选择以及使用相同的通用选择方案的结合、分隔和扩增的逐步迭代，以达到所需的结合亲和力和选择性。从核酸混合物(其可以包含随机化序列的区段)开始，SELEX方法包括以下步骤：在有利于结合的条件下使混合物与靶标接触；分隔未结合的核酸与那些已经特异性结合至靶分子的核酸；使核酸-靶标复合物解离；扩增从核酸-靶标复合物解离的核酸以产生富集配体的核酸混合物。将结合、分隔、解离和扩增的步骤根据需要重复多个循环，以产生针对靶分子的高特异性、高亲和力核酸配体。

[0338] 通常，将此类结合分子单独给予动物[参见例如，O'Connor(1991)J.Neurochem.56:560]，但是此类结合分子还可以在体内从宿主细胞吸收的多核苷酸表达以及在体内表达[参见例如，Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press,博卡拉顿,佛罗里达州(1988)]。

[0339] 7.筛选测定

[0340] 在某些方面，本公开文本涉及BMP10前肽用于鉴定作为BMP拮抗剂的化合物(药剂)的用途。可以测试通过此筛选鉴定的化合物以评估所述化合物调节心脏组织的能力，评估所述化合物在体内或体外调节组织变化的能力。可以在例如动物模型中测试这些化合物。

[0341] 存在多种方法用于通过靶向TGFβ超家族配体信号传导(例如，SMAD信号传导)来筛选调节组织生长的治疗剂。在某些实施方案中，可以进行化合物的高通量筛选以鉴定扰乱TGFβ超家族受体介导的对所选细胞系的影响的药剂。在某些实施方案中，进行所述测定以筛选和鉴定特异性地抑制或降低BMP10前肽与结合配偶体(包括例如BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b)结合的化合物。可替代地，所述测定可以用于鉴定增强BMP10前肽与结合配偶体如配体结合的化合物。在另一实施方案中，所述化合物可以通过其与BMP10前肽相互作用的能力被鉴定。

[0342] 多种测定形式将足够，并且根据本公开文本，本领域普通技术人员将理解本文未明确描述的那些。如本文所描述，本发明的测试化合物(药剂)可以通过任何组合化学方法产生。可替代地，主题化合物可以是在体内或在体外合成的天然存在的生物分子。要针对充当组织生长调节剂的能力加以测试的化合物(药剂)可以例如由细菌、酵母、植物或其他生

物产生(例如,天然产物),化学地产生(例如,小分子,包括肽模拟物),或重组地产生。本发明考虑的测试化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、肽模拟物、糖、激素和核酸分子。在某些实施方案中,测试剂是分子量低于约2,000道尔顿的有机小分子。

[0343] 本公开文本的测试化合物可以作为单个的离散实体提供,或者在复杂性较高的文库中提供,如通过组合化学来制备。这些文库可以包括例如醇、烷基卤、胺、酰胺、酯、醛、醚和其他种类的有机化合物。尤其是在初始筛选步骤中,测试化合物可以按分离的形式或作为化合物的混合物被呈递至测试系统。任选地,所述化合物可以任选地用其他化合物衍生化并具有促进化合物分离的衍生化基团。衍生化基团的非限制性例子包括生物素、萤光素、地高辛、绿色萤光蛋白、同位素、多组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、光可激活的交联剂或其任何组合。

[0344] 在测试化合物和天然提取物的文库的许多药物筛选程序中,需要高通量测定以使在给定时间段中观测的化合物的数目最大化。在无细胞系统中进行的测定(如可以用纯化的或半纯化的蛋白质衍生的)通常优选作为“主要”筛选,因为它们可以产生以允许快速发展并且相对容易地检测到由测试化合物介导的分子靶标中的改变。此外,测试化合物的细胞毒性或生物利用度的影响通常可以在体外系统中忽略,而所述测定主要集中于药物对分子靶标的作用,这可能表现为BMP10前肽与结合配偶体(包括例如BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b)之间的结合亲和力的改变。

[0345] 仅用于说明,在本公开文本的示例性筛选测定中,使目标化合物与分离和纯化的BMP10前肽接触,所述BMP10前肽通常能够与TGF-β超家族配体结合,如适合于测定的意图。然后将化合物和BMP10前肽的混合物添加至含有适当配体(例如BMP10、BMP9、BMP6、BMP5和BMP3b)的组合物中。BMP10前肽-超家族配体复合物的检测和定量提供了用于确定化合物在抑制(或增强)BMP10前肽与其结合蛋白之间的复合物形成方面的功效的方法。所述化合物的功效可以通过从使用各种浓度的测试化合物获得的数据产生剂量-反应曲线来评估。此外,还可以进行对照测定以提供用于比较的基线。例如,在对照测定中,将分离和纯化的配体添加至含有BMP10前肽的组合物中,并且在不存在测试化合物的情况下定量BMP10前肽-配体复合物的形成。应当理解,一般来说,可以改变可共混反应物的顺序,并且可以同时共混。此外,代替纯化的蛋白质,细胞提取物和溶解产物可以用于提供适合的无细胞测定系统。

[0346] 可以通过多种技术检测BMP10前肽与另一种蛋白质的结合。例如,可以使用例如可检测标记的蛋白质,如放射性标记的(例如,^{32}P、^{35}S、^{14}C或^{3}H)、萤光标记的(例如,FITC)或酶标记的BMP10前肽和/或结合蛋白,通过免疫测定或通过色谱检测来定量复合物形成的调节。

[0347] 在某些实施方案中,本公开文本考虑使用萤光偏振测定和萤光共振能量转移(FRET)测定来直接或间接地测量BMP10前肽与结合蛋白之间的相互作用程度。另外,其他检测模式(如基于光学波导(PCT公开案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)与本公开文本的许多实施方案兼容。

[0348] 此外,本公开文本考虑使用相互作用陷阱测定(interaction trap assay,也称为“双杂交测定”)用于鉴定破坏或加强BMP10前肽与结合配偶体之间的相互作用的药剂。参见例如,美国专利号5,283,317;Zervos等人(1993)Cell72:223-232;Madura等人(1993)J

Biol Chem 268:12046-12054;Bartel等人(1993)Biotechniques 14:920-924;和Iwabuchi等人(1993)Oncogene8:1693-1696。在具体的实施方案中,本公开文本考虑使用反向双杂交系统来鉴定断绝BMP10前肽与结合蛋白之间相互作用的化合物(例如,小分子或肽)[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]。

[0349] 在某些实施方案中,主题化合物是通过其与BMP10前肽相互作用的能力被鉴定。所述化合物与所述BMP10前肽之间的相互作用可以是共价的或非共价的。例如,这种相互作用可以在蛋白质水平上使用体外生物化学方法来鉴定,所述方法包括光交联、放射性标记配体结合和亲和色谱[Jakoby WB等人(1974)Methods in Enzymology 46:1]。在某些情况下,可以在基于机制的测定(如用于检测与BMP10前肽结合的化合物的测定)中筛选化合物。这可以包括固相或流体相结合事件。可替代地,编码BMP10前肽的基因可以用报告系统(例如,β-半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色萦光蛋白)转染到细胞中,并且优选通过高通量筛选或用文库的单独成员针对文库进行筛选。可以使用其他基于机制的结合测定;例如,检测自由能变化的结合测定。结合测定可以用固定至孔、珠粒或芯片或通过固定化抗体捕获的靶标进行或通过毛细管电泳进行解析。通常可以使用比色终点或萦光或表面等离子体共振来检测已结合的化合物。

[0350] 8.示例性治疗用途

[0351] 如本文所述,已发现BMP拮抗剂对于治疗和预防心力衰竭的各种并发症具有惊人的效果。例如,显示可溶性BMP10前肽(BMP10pro)多肽可以用于在横向主动脉缩窄(TAC)心力衰竭模型中预防心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化或者降低心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化的严重程度,以及改善心脏功能。此外,BMP10pro治疗增加了心力衰竭患者的存活时间。在心肌梗塞(MI)心脏病模型中观察到BMP10pro治疗的类似有益效果。此外,与BMP10和BMP9结合的可溶性内皮糖蛋白多肽在TAC和MI心力衰竭模型中也均显示出积极效果。因此,本公开文本部分地提供了单独地使用BMP拮抗剂或与一种或多种另外的支持疗法和/或另外的活性剂组合使用的方法,以治疗、预防心力衰竭或者降低心力衰竭的严重程度,特别是治疗、预防心力衰竭的一种或多种并发症(例如,心脏肥大、心脏重塑和心肌纤维化)或降低心力衰竭的一种或多种并发症的严重程度,以及改善心脏功能和增加心力衰竭患者的存活时间。

[0352] 如本文所用,“预防”障碍或病症的治疗剂是指如下化合物,其在统计样品中相对于未治疗的对照样品降低了治疗的样品中所述障碍或病症的发生,或相对于未治疗的对照样品延迟了所述障碍或病症的发作。如本文所用的术语“治疗”包括一旦确诊就改善或消除病症。在任一种情况下,可以在医生或其他医疗服务人员提供的诊断和所述治疗剂的给予的预期结果中辨别预防或治疗。

[0353] 一般而言,通过以有效量给予一种或多种BMP拮抗剂来实现如本公开文本中描述的疾病或病症的治疗或预防。药剂的有效量是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下有效实现所需的治疗或预防结果的量。本公开文本的药剂的治疗有效量可以根据诸如以下等因素而变:疾病状态、个体的年龄、性别和体重以及药剂诱发个体的所需反应的能力。预防有效量是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下有效实现所需的预防结果的量。

[0354] 心力衰竭是通过由心脏的某些结构或功能异常引起的典型症状和体征定义的临床综合征(ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.McMurray J J等人European Heart Journal 2012,14(8):803-69;2013ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure,Yanzy C W等人Circulation 2013,128,e240-e327)。例如,心脏异常可能损害充盈或喷射血液的能力和/或导致不能输送足够的氧气以满足代谢组织的要求,尽管充盈压力正常或者仅以增加的充盈压力为代价。如本文所用,术语心力衰竭涵盖多种心血管病症,其包括但不限于:由左心室功能不全引起的心力衰竭、具有正常射血分数的心力衰竭、由主动脉狭窄引起的心力衰竭、急性心力衰竭、慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、先天性心力衰竭、代偿性心力衰竭、失代偿性心力衰竭、舒张性心力衰竭、收缩性心力衰竭、右侧心力(心室)衰竭、左侧心力(心室)衰竭、双心室心力衰竭、前向性心力衰竭、后向性心力衰竭、高输出量性心力衰竭和低输出量性心力衰竭。心力衰竭还包括与心脏液体积聚有关的心脏病,如心肌水肿。

[0355] 一般而言,心力衰竭的临床表现包括例如呼吸困难(呼吸短促)、端坐呼吸、阵发性夜间呼吸困难和疲劳(这可能限制运动耐量)、液体潴留(这可能导致例如肺充血和外周性水肿)、心绞痛、高血压、心律失常、室性心律失常、心肌病、心脏肥大、心源性哮喘、夜尿症、腹水、充血性肝病、凝血病、肾血流量减少、肾功能不全、心肌梗塞和中风。

[0356] 虽然短语“充血性心力衰竭”通常用于描述所有类型的心力衰竭,包括上面列出的类型,但充血性心力衰竭更准确地描述了心力衰竭与肺充血或肺部液体积聚有关的症状。这种充血更常见于收缩期和左侧心力衰竭的症状。随着肺系统的效率下降,心脏输入侧附近增加的血容量改变了肺泡动脉界面即肺毛细血管与肺部的肺泡腔之间的界面处的压力。界面处压力的变化导致血浆被推入肺部的肺泡空间中。呼吸困难和全身疲劳是充血性心力衰竭的典型感知临床表现。

[0357] 有许多不同的方法可以对心力衰竭进行分类。例如,可以基于所涉及的心脏侧来表征心力衰竭(左心力衰竭与右心力衰竭)。右心力衰竭损害肺部的肺血流。左心力衰竭损害身体和大脑的主动脉血流。混合呈现是常见的;就长期而言,左心力衰竭通常会导致右心力衰竭。也可以关于异常是由收缩不足(收缩功能障碍;收缩性心力衰竭)引起还是由心脏舒张不足(舒张功能障碍;舒张性心力衰竭)引起或由两者引起,对心力衰竭进行分类。另外,可以关于问题主要是增加的静脉背压(前负荷)还是不能提供足够的动脉灌注(后负荷)来对心力衰竭进行分类。可以关于异常是由伴随高全身血管阻力的低心输出量还是伴随低血管阻力的高心输出量(低输出量性心力衰竭与高输出量性心力衰竭)引起,对心力衰竭进行分类。也可以根据共存疾病,例如心力衰竭/系统性高血压、心力衰竭/肺动脉高压、心力衰竭/糖尿病和心力衰竭/肾衰竭的程度对心力衰竭进行分类。

[0358] 此外,可以根据由心脏异常赋予的功能性损伤的程度对心力衰竭进行分类。功能分类通常依赖于纽约心脏协会(New York Heart Association,NYHA)的功能分类。类别(I-IV)是I类:任何活动都没有限制;普通活动时没有症状;II类:轻微,轻度的活动限制;患者在休息或轻度运动时舒适;III类:明显限制的任何活动;病人只有在休息时才会舒适;和IV类:任何身体活动都会带来不适,并且在休息时出现症状。这种评分记录了症状的严重程度,并且可用于评估对治疗的反应。

[0359] 美国心脏病学会/美国心脏协会(ACC)工作组在其2001年的指南中介绍了心力衰

竭的四个阶段[参见例如Hunt,S.,“ACC/AHA 2005Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult:A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines(Writing Committee to Update the 2001Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure),”J.Am,Coll.Cardiol,46:e1-e82(2005]。第一阶段即阶段A是处于心力衰竭高风险但没有结构性心脏病或心力衰竭症状的受试者(例如,这些受试者是患有高血压、动脉粥样硬化疾病、糖尿病、肥胖症、代谢综合征或使用心脏毒素的患者)。第二阶段即阶段B是患有结构性心脏病但没有心力衰竭的体征或症状的受试者(例如,这些受试者是先前患有心肌梗塞,展现出包括肥大和低射血分数的心脏重塑的患者,以及患有无症状瓣膜病的患者)。第三阶段即阶段C是患有伴随心力衰竭的先前或当前症状的结构性心脏病的受试者(例如,这些受试者是患有已知的结构性心脏病并且展现出呼吸短促和疲劳并且具有降低的运动耐量的患者)。第四且最后一个阶段即阶段D是需要专门干预的难治性心力衰竭(例如,尽管进行了最大程度的药物疗法但在休息时仍有明显症状的患者(即那些经常住院治疗或无法在没有专门干预的情况下安全出院的患者))。ACC分期系统是有用的,因为阶段A包含“前心力衰竭”-治疗干预可能推定会阻止向明显症状进展的阶段。ACC阶段A没有相应的NYHA类。ACC阶段B对应于NYHA I类。ACC阶段C对应于NYHA II类和III类,而ACC阶段D与NYHA IV类重叠。

[0360] 通常在心力衰竭的临床体征之前的心脏重塑是指临床上表现为通常由心脏负荷或损伤引起的心脏的大小、形状和功能的变化的分子、细胞和/或间质变化(Cohn J N等人JACC 2000.35(3):569-82)。心脏重塑的触发因素包括例如心肌梗塞、高血压、壁应力、炎症、压力超负荷和体积超负荷。心肌结构的改变可以在损伤后几小时内尽快发生,并且可能经数月和数年进展。虽然最初是有益的,但随着时间的推移(数月至数年),这些变化会损害心肌功能,达到慢性难治性心力衰竭的程度。心脏重塑的标志包括例如室扩张、心室球形度的增加、以及间质和血管周纤维化的发展。球形度的增加与二尖瓣反流正相关。心室扩张主要由心肌细胞肥大和延长引起,并且在较小程度上由心室质量的增加引起。

[0361] 在一些实施方案中,本公开文本的BMP拮抗剂可以用于治疗、预防心脏重塑或降低心脏重塑的进展。例如,BMP拮抗剂可以用于在受试者中维持心肌结构或减少心脏的心肌结构的改变。心脏重塑的进展可以通过比较两组受试者之间一段时间内心脏的心肌结构的改变来评估,其中第一组(治疗组)通过本发明的方法进行治疗,而第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂替代或代替通过本发明的方法的治疗来进行治疗。如果治疗组受试者中心脏的心肌结构的改变小于安慰剂组受试者中心脏的心肌结构的改变,则确定心脏重塑的进展降低。用于确定疾病(如心脏重塑)进展或发展的方法可以使用公知的方法来评估,所述公知的方法包括例如体检、2维超声心动图结合多普勒血流研究、超声、MRI、计算机化断层摄影术、心脏导管插入术、放射性核素显像(如放射性核素心室显像术)以及它们的任何组合。

[0362] 一般而言,心脏重塑和心力衰竭是由导致心脏工作负荷持续增加或损伤的障碍和病症引起的。导致心力衰竭的障碍和病症包括例如心肌梗塞后的存活心肌的损失、冠状动脉疾病、高血压、心肌病(例如扩张型心肌病、感染或酒精/药物滥用引起的心肌病等)、心脏瓣膜病和功能障碍(包括例如主动脉瓣疾病(例如主动脉瓣功能不全、主动脉瓣反流和主动脉狭窄(主动脉狭窄)))、肺障碍(例如肺动脉高压)、先天性心脏缺陷、急性缺血性损伤、再

灌注损伤、心包障碍和异常、心肌障碍、大血管障碍、心内膜障碍、心房颤动、左心室心肌功能受损、右心室心肌功能受损、心律失常、甲状腺疾病、肾病、糖尿病、导致无法泵出足够血液的心肌衰弱、甲状腺疾病、神经激素失衡、病毒感染和贫血。由于此类障碍和病症可能导致心脏重塑和/或心力衰竭，因此患有或怀疑患有这些病症中的一种或多种的受试者是优选的受试者，所述优选的受试者用于根据本发明使用一种或多种BMP拮抗剂治疗，任选地与用于治疗心脏重塑和/或心力衰竭的一种或多种另外的活性剂或支持疗法组合进行治疗。在一些实施方案中，即使无法检测到潜在的病因，有心脏重塑(例如心肌肥大和心室扩张)或明显心力衰竭体征的受试者也适合于根据本公开文本的治疗，因为预防进一步的心脏重塑或治疗现有的心脏重塑或降低心脏重塑在这些受试者中将是有益的。在一些实施方案中，具有心脏重塑和/或心力衰竭发展的风险因子的受试者(例如患有可导致本文所述的心脏重塑和/或慢性心力衰竭的那些病症的受试者)也适合于根据本公开文本的治疗。

[0363] 一般而言，高血压或血压高是指用例如血压计测量的静息血压大于120mmHg(收缩压)/80mmHg(舒张压)。在121-139/81-89之间被认为是高血压前期，并且高于此水平(140/90mmHg或更高)被认为是血压高(高血压)。除非另有说明，否则高血压前期和高血压病均包含在如本文所用的“高血压”的含义中。例如，135mmHg/87或140mmHg/90mmHg的静息血压旨在在术语“高血压”的范围内，即使135/87通常被认为是在高血压前期类别中。145mmHg/90mmHg、140mmHg/95mmHg和142mmHg/93mmHg的血压是高血压的其他例子。应当理解，血压在一天中通常是变化的。它甚至可以随着每次心跳而略有不同。通常，它在活动期间升高并在休息时降低。它在寒冷的天气里通常会较高，并且在压力下会升高。通过每日监测血压可以获得更准确的血压读数，其中每天在同一时间采集血压读数，以最大限度地减少外部因素的影响。可能需要随着时间的多个读数来确定血压是否为高。一般而言，慢性高血压是指受试者在延长的时间段(例如但不限于至少一周、至少两周、至少三周、至少四周、至少两个月、至少六个月、至少一年、至少两年、至少三年、至少四年、至少五年、至少10年等)内连续地或间歇地展现出高血压。

[0364] 一般而言，心律失常是指心脏的肌肉收缩变得不规律的病症。异常快速的心律(例如，每分钟超过100次心跳)被称为心动过速。异常缓慢的心律(例如，每分钟少于60次心跳)被称为心动过缓。

[0365] 一般而言，心脏肥大是指心脏扩大，即具有如下特征的病症：心脏和单个心肌细胞、特别是心室肌细胞的大小增加，以及心腔的内腔大小的增加。

[0366] 射血分数是每次心跳时从左心室泵出的血液百分比。例如，可以在超声心动图期间测量射血分数。射血分数是心脏泵血能力的重要量度，并且可以用于对心力衰竭进行分类并指导治疗。心力衰竭可以归类为具有保持的射血分数的心力衰竭(也称为舒张性心力衰竭)或归类为具有降低的射血分数的心力衰竭(也称为收缩性心力衰竭)。最近的一项研究表明，具有保持的射血分数的心力衰竭的患病率在15年时间段内增加，但死亡率没有明显改善。如果这些趋势持续下去，具有保持的射血分数的心力衰竭可能成为心力衰竭最常见的形式，这表明公共卫生问题日益严重(Owan等人，2006，N Engl J Med；355(3)：251-9)。

[0367] 在一些实施方案中，本公开文本的BMP拮抗剂可以用于降低非致命或致命心血管事件(例如，心肌梗塞、中风、心绞痛、心律失常、液体潴留和心力衰竭进展)的发生率。如本文所用，降低心血管事件的发生率是指维持或降低受试者在一段时间的历程期间或历程中

经历的心血管事件的数量。心血管事件的发生率的降低可以通过比较两组受试者在一段时间的历程中或历程期间的心血管事件的发生率来评估或确定，其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗，而第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即假丸剂)替代或代替通过本发明的方法的治疗来进行治疗。如果治疗组的心血管事件的数量少于安慰剂组的心血管事件的数量，则确定心血管事件的发生率降低或已经降低。可替代地，心血管事件的发生率的降低可以通过确定第一时间段受试者群体的心血管事件的基线数量，随后测量第二、更晚时间段受试者群体的心血管事件的数量来评估或确定。如果第二、更晚时间段的受试者群体的心血管事件的数量等同于或少于在第一时间段的受试者群体的心血管事件的数量，则确定所述受试者群体的心血管事件的发生率已经降低。

[0368] 在一些实施方案中，本公开文本的BMP拮抗剂可以用于降低心力衰竭的住院治疗的发生率。如本文所用，降低心力衰竭住院治疗的发生率是指维持或降低受试者在一段时间的历程期间历程中经历的心力衰竭住院治疗次数。住院治疗的发生率的降低可以通过比较两组受试者在一段时间的历程中或历程期间的心力衰竭住院治疗的发生率来评估或确定，其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗，而第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即假丸剂)替代或代替通过本发明的方法的治疗来进行治疗。如果治疗组的心力衰竭住院治疗的次数少于安慰剂组的心力衰竭住院治疗的次数，则确定心力衰竭住院治疗的发生率降低或已经降低。可替代地，心力衰竭住院治疗的发生率的降低可以通过确定第一时间段受试者群体的心力衰竭住院治疗的次数，随后测量第二、更晚时间段受试者群体的心力衰竭住院治疗的次数来评估或确定。如果第二、更晚时间段的受试者群体的心力衰竭住院治疗的次数等同于或少于第一时间段的受试者群体的心力衰竭住院治疗的次数，则确定所述受试者群体的心力衰竭住院治疗的发生率已经降低。

[0369] 在一些实施方案中，本公开文本的BMP拮抗剂可以用于改善心力衰竭患者的存活。如本文所用，改善心力衰竭患者的存活是指维持或降低受试者群体在一段时间的历程期间或在一段时间的历程中经历的致命心血管事件的数量。心力衰竭患者的存活的改善可以通过比较两组受试者在一段时间的历程中或历程期间的致命心血管事件的发生率来评估或确定，其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗，而第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即假丸剂)替代或代替通过本发明的方法的治疗来进行治疗。如果治疗组的致命心血管事件的数量少于安慰剂组的致命心血管事件的数量，则确定心力衰竭患者的存活得到改善或已经得到改善。可替代地，致命心血管事件的发生率的降低可以通过确定第一时间段的受试者群体的致命心血管事件的基线数量，随后测量第二、更晚时间段的受试者群体的致命心血管事件的数量来评估或确定。如果第二、更晚时间段的受试者群体的致命心血管事件的数量等同于或少于在第一时间段的受试者群体的致命心血管事件的数量，则确定所述受试者群体的心力衰竭患者的存活已经改善。

[0370] 在一些实施方案中，本公开文本的BMP拮抗剂可以用于降低心力衰竭患者的心血管死亡的风险。如本文所用，降低心力衰竭患者心血管死亡的风险是指维持或降低受试者群体在一段时间的历程期间或历程中经历的致命心血管事件的数量。心力衰竭患者的心血管死亡的降低可以通过比较两组受试者在一段时间的历程中或历程期间的致命心血管事件的发生率来评估或确定，其中第一组(治疗组)通过本发明的方法治疗，而第二组(安慰剂组)通过使用安慰剂(即假丸剂)替代或代替通过本发明的方法的治疗来进行治疗。如果治

疗组的致命心血管事件的数量少于安慰剂组的致命心血管事件的数量，则确定心力衰竭患者中心血管死亡降低或者已经降低。可替代地，心力衰竭患者的心血管死亡的降低可以通过确定第一时间段的受试者群体的致命心血管事件的基线数量，随后测量第二、更晚时间段的受试者群体的致命心血管事件的数量来评估或确定。如果第二、更晚时间段的受试者群体的致命心血管事件的数量等同于或少于在第一时间段的受试者群体的致命心血管事件的数量，则确定所述受试者群体的心力衰竭患者的心血管死亡已经降低。

[0371] 目前正在使用多种批准的药物和支持疗法来管理患有心力衰竭的患者以及处于心力衰竭风险的患者(例如，患有高血压、脂质障碍、糖尿病和血管障碍的患者)。此类药物包括例如肾上腺素能阻断剂(α和β阻断剂)、中枢作用的α激动剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物、血管扩张剂、苯二氮卓类、肾素抑制剂、抗血栓形成剂和多种类型的利尿剂(例如髓袢利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪利尿剂和噻嗪样利尿剂)。用于治疗或预防心力衰竭的外科手术包括例如物理操作以试图通过球囊血管成形术或支架术增加缩窄动脉的内部大小。在一些实施方案中，本公开文本提供了治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的方法，其包括给予BMP拮抗剂与用于治疗、预防心力衰竭或降低心力衰竭进展的另外的活性剂或支持疗法(例如，肾上腺素能阻断剂、中枢作用的α激动剂、ACE抑制剂、血管紧张素II受体阻断剂、钙通道阻断剂、正性强心药物、利尿剂和多种外科手术)的组合。

[0372] ACE抑制剂已被用于治疗高血压多年。ACE抑制剂特别是在心力衰竭患者中阻断血管紧张素II的形成，血管紧张素II是对心脏和血液循环有不良影响的激素。这些药物的副作用包括例如干咳、低血压、肾功能恶化和电解质失衡，有时还有过敏反应。ACE抑制剂的例子包括卡托普利(例如Capoten)、依那普利(例如Vasotec、悦您定(Renitec)和Enacard)、赖诺普利(捷赐瑞(Zestril)和心宁卫(Prinivil))、苯那普利(Lotensin)、雷米普利(例如Altace、Prilace、Ramace、Ramiwin、Triatec和Tritace)、佐芬普利、喹那普利(例如Accupril)、培哚普利(例如Coversyl、艾声诺(Aceon)和Perindo)、赖诺普利(例如Listril、乐普利(Lopril)、Novatec、心宁卫和捷赐瑞)、苯那普利(例如洛汀新(Lotensin))、咪达普利(例如泰纳普利(tanatril))、群多普利(例如Mavik、Odrik和Gopten)、西拉普利(例如抑制剂)和福辛普利(例如Fositen和蒙诺(Monopril))。

[0373] 一般而言，不能耐受ACE抑制剂的患者用血管紧张素受体阻断剂治疗。这些药物与ACE抑制剂作用于相同的激素途径，但直接阻断血管紧张素II在其受体位点的作用。尽管干咳不太常见，但这些药物的副作用类似于与ACE抑制剂相关的那些副作用。可根据本公开文本使用的血管紧张素受体阻断剂包括例如氯沙坦(例如科素亚(Cozaar))、坎地沙坦(例如Atacand)、缬沙坦(例如代文(Diovan))、厄贝沙坦(例如Avapro)、替米沙坦(例如美卡素(Micardis))、依普罗沙坦(例如Teveten)、奥美沙坦(例如Benicar和Olmetec)、阿齐沙坦(Edarbi)和非马沙坦(例如Kanarb)。

[0374] 肾上腺素能阻断剂是阻断作用于各种身体组织的β受体的某些刺激激素(如肾上腺激素(肾上腺素)、去甲肾上腺素和其他类似的激素)的作用的药物。这些激素对心脏的肾上腺素能受体的自然作用是心肌的更有力的收缩。这些激素的刺激作用虽然最初用于维持心脏功能，但显现随着时间的推移对心肌有不利作用。β阻断剂(例如，非特异性、β_1选择性、β_2选择性和β_3选择性阻断剂)是阻断这些刺激激素对β受体的作用的药剂。α阻断剂(例如，非

特异性、α_1选择性和α_2选择性)是阻断这些刺激激素对α受体的作用的药剂。通常,如果慢性心脏病患者接受肾上腺素能阻断剂,则首先以非常低的剂量给予它们,然后逐渐增加。副作用包括例如液体潴留、低血压、低脉搏和全身疲劳和头晕。肾上腺素能阻断剂也不应当用于患有气道疾病(例如,哮喘和肺气肿)或静息心率非常低的人。可以根据本公开文本使用的肾上腺素能阻断剂包括例如普萘洛尔、布新洛尔、卡替洛尔(例如Cartrol、Ocupress、Teoptic、Arteolol、Arteoptic、Calte、Cartéabak、Carteol、Cartéol、Cartrol、Elebloc、Endak、Glauteolol、美开朗(Mikelan)、Poenglaucol和Singlauc)、卡维地洛(例如Coreg)、拉贝洛尔(例如Normodyne和湍泰低(Trandate))、纳多洛尔(例如Corgard)、氧烯洛尔(例如Trasacor、Trasicor、Coretal、Laracor、Slow-Pren、Captol、Corbeton、Slow-Trasicor、Tevacor、Trasitensin、Trasidex)、喷布洛尔(例如Levatol、Levatolol、Lobeta、Paginol、Hostabloc、Betapressin)、吲哚洛尔(例如Visken)、索他洛尔(例如Betapace、Betapace AF、Sotalex、Sotacor和Sotylize)、噻吗洛尔(例如betimol)、醋丁洛尔(例如Sectral和Prent)、阿替洛尔(例如天诺敏)、倍他洛尔(例如Betoptic、Betoptic S、Lokren和Kerlone)、比索洛尔(例如Zebeta和Concor)、塞利洛尔(例如Cardem、Selectol、Celipres、Celipro、Celol、Cordiax、Dilanorm)、艾司洛尔(例如brevibloc)、美托洛尔(例如Lopressor和Metolar XR)、奈比洛尔(例如Nebilet和Bystolic)、butazamine、ICI-118,551、SR 59230A、苯氧苄胺(例如Dibenzyline)、酚妥拉明(例如酚妥拉明)、妥拉唑啉、曲唑酮、阿夫唑嗪(例如uroxatral、Xat、桑塔(Xatral)、Prostetrol和Alfural)、甲磺酸多沙唑嗪(Cardura和Carduran)、哌唑嗪(例如Minipress、Vasoflex、Lentopres和Hypovase)、坦索罗辛(Flomax)、特拉唑嗪(例如Hytrin和Zayasel)、西洛多辛(例如Rapaflo、Silodyx、Rapilif、Silodal、优列扶(Urief)、Thrupas和Urorec)、阿替美唑(例如Antisedan)、咪唑克生、米氮平(例如瑞美隆(Remeron))和育亨宾(yohimbine)。

[0375] 利尿剂通常用于治疗心力衰竭患者,以预防或缓解液体潴留的症状。这些药物通过促进肾脏中的液体流动来帮助防止液体积聚在肺部和其他组织中。尽管它们可有效缓解症状如呼吸短促和腿部肿胀,但尚未证明它们对长期存活有积极影响。利尿剂的副作用包括脱水、电解质异常(特别是低钾水平)、听力障碍和低血压。在一些患者中,通过向患者提供补充剂来预防低钾水平是重要的,因为电解质失衡可能使患者容易受到严重的心律紊乱的影响。各种利尿剂的例子包括:酸化盐(例如$CaCl_2$和NH_4CL)、精氨酸加压素受体2拮抗剂(例如两性霉素B和柠檬酸锂)、选择性加压素V2拮抗剂(例如tolvapatan和考尼伐坦)、Na-H交换剂拮抗剂(例如多巴胺)、碳酸酐酶抑制剂(例如乙酰唑胺和多佐胺)、髓袢利尿剂(例如布美他尼、依他尼酸、呋塞米和托拉塞米)、渗透性利尿剂(例如葡萄糖和甘露糖醇)、保钾利尿剂(例如阿米洛利、螺内酯、依普利酮、氨苯蝶啶和坎利酸钾)、噻嗪(例如苄氟噻嗪、氢氯噻嗪和美托拉宗)、黄嘌呤(例如茶碱和可可碱)。

[0376] 钙通道阻断剂破坏钙通过钙通道的运动,并且经常用作抗高血压药物。钙通道阻断剂在治疗大血管僵硬方面特别有效,大血管僵硬是老年患者收缩压升高的常见原因之一。钙通道阻断剂也经常用于改变心率、预防脑血管痉挛和减少由心绞痛引起的胸痛。钙通道阻断剂的副作用包括例如头晕、头痛、水肿、改变的心率和便秘。各种类别的钙通道阻断剂的例子包括:二氢吡啶钙通道阻断剂[例如氨氯地平(例如Norvasc)、阿雷地平(例如Sapresta)、阿折地平(例如Calblock)、巴尼地平(例如HypoCa)、贝尼地平(例如Coniel)、西

尼地平(例如Atelec、Cinalong和Siscard)、氯维地平(例如Cleviprex)、伊拉地平(例如DynaCirc和Prescal)、依福地平(例如Landel)、非洛地平(例如Plendil)、拉西地平(例如Motens、Lacipil)、乐卡地平(例如Zanidip)、马尼地平(例如Calslot和Madipine)、尼卡地平(例如Cardene和Carden SR)、硝苯地平(例如Procardia和Adalat)、尼伐地平(例如Nivadil)、尼莫地平(例如Nimotop)、尼索地平(例如Baymycard、Sular和Syscor)、尼群地平(例如Cardif、Nitrepin和Baylotensin)和普拉地平(例如Acalas)]、苯基烷胺钙通道阻断剂[例如维拉帕米(例如Calan和Isoptin)、戈洛帕米和芬地林]、苯并硫氮杂卓钙通道阻断剂(例如地尔硫卓)、咪拉地尔、苄普地尔、氟桂利嗪、氟司必林、芬地林、gabapentinoid(例如加巴喷丁和普瑞巴林)和齐考诺肽。

[0377] 强心药物是改变肌肉收缩力或能量的药剂。通过增加细胞内钙的浓度或增加受体蛋白对钙的敏感性,正性肌力药可以增加心肌收缩性。正性肌力药的例子包括:地高辛、胺碘酮、小檗碱、钙、左西孟旦、奥美坎替、儿茶酚胺(例如多巴胺、多巴酚丁胺、多培沙明、肾上腺激素、异丙肾上腺素和去甲肾上腺素)、血管紧张素II、类花生酸(例如前列腺素)、磷酸二酯酶抑制剂(例如依诺昔酮、米力农、氨力农和茶碱)、胰高血糖素和胰岛素。

[0378] 血管扩张剂直接作用于动脉的平滑肌,使其壁放松,从而使血液更容易地穿过它们移动。一般而言,血管扩张剂仅用于高血压急症或其他药物已经失败的情况,并且很少单独给予。用于治疗心力衰竭的主要血管扩张剂包括硝酸盐和肼苯哒嗪及其衍生物。可根据本公开文本使用的血管扩张剂包括例如硝普钠、肼苯哒嗪(例如Apesoline和BiDil)、二硝酸异山梨酯(Dilatrate和Isordil)和单硝酸异山梨酯(例如ISMO)、硝酸甘油(例如Nitro-Dur、Nitrolingual和Nitrostat)。

[0379] 尽管存在争议,但苯二氮卓类可能在降低血压方面发挥作用。它们作为大脑中GABA-a受体的激动剂起作用,从而减缓神经传递和扩张血管。GABA属于抑制性神经递质(甘氨酸、腺苷等)。GABA-a受体是作为苯二氮卓类的主要靶标的离子通道。当激动剂与此受体位点结合时,蛋白质通道打开,允许负氯离子进入通道并穿透电压门控离子位点。因此,在患者中给予神经传递和缓解压力、焦虑和紧张的负反馈可能与升高的血压相关。除了GABA之外,苯二氮卓类还抑制称为腺苷的核苷化学物质的再摄取,充当上述抑制性化学物质。它还用作冠状血管扩张剂,使心肌放松和扩张心脏动脉。然而,苯二氮卓类的长期使用伴随依赖性和耐受性,这可能是GABA-a受体下调的结果。因此,即使在健康个体中,戒断症状包括高血压。

[0380] 在肾素-血管紧张素系统中,肾素比血管紧张素转化酶(ACE)高一级。因此,肾素的抑制剂可以有效地减少高血压病。阿利吉仑是一种肾素抑制剂,其已被批准用于治疗高血压。

[0381] 中枢α激动剂通过刺激大脑中的α受体来降低血压,所述α受体打开外周动脉以缓解血流。这些α2受体被称为自身受体,其在神经传递中提供负反馈(在这种情况下,负反馈是肾上腺素的血管收缩作用)。当所有其他抗高血压药物都失败时,通常会开出中枢α激动剂。对于治疗高血压,这些药物通常与利尿剂组合给予。这类药物的副作用包括镇静、鼻粘膜干燥和反跳性高血压。可根据本公开文本使用的中枢α激动剂包括例如可乐定(例如Catapres、Kapvay、Nexiclon和Clophelin)、胍那苄(例如Wytensin)、胍法辛(例如Estulic、Tenex和Intuniv)、甲基多巴(例如Aldomet、Aldoril和Dopamet)和莫索尼定(Physiotens)、

米诺地尔(例如Loniten)、胍乙啶(例如Micromedex)、美卡拉明(例如Inversine和Vecamyl)和利血平(例如Raudixin、Serpalan和Serpasil)。

[0382] 一般而言,抗血栓形成剂是减少血凝块(血栓)形成的药物。抗血栓药物可以在治疗上用于预防(一级预防、二级预防)或治疗危险血凝块(急性血栓)。不同的抗血栓药物影响不同的血液凝结过程。抗血小板药物限制血小板的迁移或聚集。抗凝血剂限制血液凝结的能力。溶栓药物在凝块形成后用于溶解凝块。可根据本公开文本使用的抗血栓形成剂包括例如不可逆的环氧合酶抑制剂[例如阿司匹林和三氟醋柳酸(例如Disgren)]、二磷酸腺苷受体抑制剂[例如氯吡格雷(例如Plavix)、普拉格雷(例如Effient)、替格瑞洛(例如Brilinta)和噻氯匹定(例如Ticlid)]、磷酸二酯酶抑制剂[例如西洛他唑(例如Pletal)]、蛋白酶激活的受体-1拮抗剂[例如沃拉帕沙(例如Zontivity)]、糖蛋白IIB/IIIA抑制剂[例如阿昔单抗(例如ReoPro)、依替巴肽(例如Integrilin)、替罗非班(例如Aggrastat)]、腺苷再摄取抑制剂[例如双嘧达莫(例如Persantine)]、凝血噁烷抑制剂[例如凝血噁烷合酶抑制剂和凝血噁烷受体拮抗剂(例如Terutroban)]、组织纤溶酶原激活剂[例如阿替普酶(例如Activase)、瑞替普酶(例如Retavase)、替奈普酶(例如TNKase)]、阿尼普酶(例如Eminase)、链激酶(例如Kabikinase和Streptase)、尿激酶(例如Abbokinase)、达比加群、利伐沙班、阿哌沙班、香豆素(例如华法林、brodifacoum和difenacoum)、肝素及其衍生物、因子Xa抑制剂(例如磺达肝癸钠和艾卓肝素)、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、贝曲西班、来他沙班、伊利巴西班、水蛭素、来匹卢定、比伐卢定、阿加曲班、达比加群、希美加群(例如Exanta)、抗凝血酶蛋白(例如Atryn)、巴曲酶、裂纤酶和维生素E。

[0383] 除了心力衰竭的药理学治疗外,还有用于治疗心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的多种支持疗法,包括例如外科手术和医疗装置。

[0384] 最常见的心力衰竭医疗装置之一是起搏器。起搏器通常是放置在患者胸部或腹部的小型装置,以帮助控制异常的心律。这些装置使用低能量脉冲以促使心脏以正常速率跳动(例如,治疗心律失常)。存在不同类型的起搏器装置,它们为不同类型的心律失常提供治疗。

[0385] 在患有严重心肌病(例如,左心室射血分数低于35%)的人中或在患有复发性心室性心动过速或恶性心律失常的人中,使用自动植入式复律除颤器治疗可降低严重危及生命的心律失常的风险。自动植入式复律除颤器不会改善症状或降低恶性心律失常的发生率,但确实降低了心律失常引起的死亡率,其通常与抗心律失常药物一起使用。在左心室射血低于35%的人中,心室性心动过速或心源性猝死的发生率足够高以批准AICD的放置。

[0386] 心脏收缩力调节(CCM)是一种针对患有中度到重度左心室收缩性心力衰竭(NYHA II-IV类)的人的治疗,所述治疗增强心室收缩强度和心脏泵血能力。CCM机制是基于通过非兴奋性电信号刺激心肌,所述非兴奋性电信号由类似起搏器的装置传递。CCM特别适合于治疗具有正常QRS波群持续时间(120ms或更短)的心力衰竭,并且已被证明可改善症状、生活质量和运动耐量。

[0387] 左心室射血分数低于35%的人中约有三分之一的人对心室的传导有明显改变,导致了右心室和左心室的不同步去极化。这对于具有左束支传导阻滞的人来说尤其成问题(阻断起源于心脏基部并且向左心室传递去极化脉冲的两个主要传导纤维束中的一个)。使用特殊的起搏算法,双心室心脏再同步疗法(CRT)可以启动正常的心室去极化序列。对于左

心室射血分数低于35％且心电图上的QRS持续时间延长(LBBB或QRS为150ms或更长)的人，当将CRT添加至标准药物疗法时症状和死亡率有所改善。

[0388] 患有最严重的心力衰竭的人可以是心室辅助装置(VAD)的候选者。VAD通常被用作心脏移植的桥梁，但最近已被用作晚期心力衰竭的终点治疗。在选择的情况下，可以考虑心脏移植。虽然这可能解决与心力衰竭相关的问题，但这个人通常必须保持处于免疫抑制方案以防止排斥，这有其自身的重大缺点。这种治疗选择的一个主要限制是可用于移植的心脏稀缺。

[0389] 9.药物组合物

[0390] 在某些方面，本公开文本的BMP拮抗剂或此类拮抗剂的组合可以单独给予或作为药物配制品(也称为治疗组合物或药物组合物)的组分给予。药物配制品是指如下制剂，其呈使得其中所含活性成分(例如，本公开文本的药剂)的生物活性有效的形式，并且不含对给予配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。主题化合物可以配制用于以任何方便的方式给予以供在人或兽医医学中使用。例如，本公开文本的一种或多种药剂可以与药学上可接受的载体一起配制。药学上可接受的载体是指药物配制品中除活性成分之外的成分，其通常对受试者无毒。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/防腐剂。一般而言，当给予受试者时，用于本公开文本的药物配制品呈无热原的、生理学上可接受的形式。可任选地包含在如上所述配制品中的除了本文所述药剂之外的治疗上有用的药剂可以在本公开文本的方法中与主题药剂组合给予。

[0391] 在某些实施方案中，组合物将肠胃外地[例如，通过静脉内(I.V.)注射、动脉内注射、骨内注射、肌内注射、鞘内注射、皮下注射或皮内注射]给予。适合于肠胃外给予的药物组合物可以包含本公开文本的一种或多种药剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液或可以刚好在使用之前重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末的组合。可注射溶液或分散液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂或使所述配制品与预期接受者的血液等渗的溶质。可用于本公开文本的药物配制品中的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、植物油(例如，橄榄油)、可注射有机酯(例如，油酸乙酯)及其合适的混合物。例如，通过使用包衣材料(例如，卵磷脂)，在分散液的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂，可以维持适当的流动性。

[0392] 在一些实施方案中，将化合物给予至心脏，包括例如通过心脏内给予、心包内给予或通过植入物或装置来给予。例如，通过制作胸廓或剑突下切口以进入和切割或刺穿心包囊，可以从身体外部进入心包腔。例如，通过使套管或导管型装置通过胸壁并随后使套管或导管或另一器械穿过心包进入心包腔而从身体外部进入心包腔，这公开于例如美国专利号5,336,252、5,827,216、5,900,433、5,972,013、6,162,195、6,206,004和6,592,552中。在某些情况下，心包囊可以通过切割器械切割，如例如在美国专利号5,931,810、6,156,009和6,231,518中所公开的。

[0393] 在一些实施方案中，本公开文本的治疗方法包括从植入物或装置全身地或局部地给予药物组合物。此外，所述药物组合物能以用于递送至目标组织部位(例如，骨髓或肌肉)的形式包封或注射。在某些实施方案中，本公开文本的组合物可以包含能够将本公开文本的一种或多种药剂递送至目标组织部位(例如，骨髓或肌肉)的基质，从而提供用于发育中

组织并且最佳地能够被吸收至体内的结构。例如，所述基质可以提供本公开文本的一种或多种药剂的缓慢释放。此类基质可以由目前用于其他植入医学应用的材料形成。

[0394] 基质材料的选择可以基于以下中的一种或多种：生物相容性、生物降解性、机械特性、美容外观和界面特性。主题组合物的特定应用将定义适当的配制品。组合物的潜在基质可以是可生物降解的且化学上定义的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸和聚酸酐。其他潜在的材料是可生物降解的且生物学上明确定义的，包括例如骨或真皮胶原。其他基质包括纯蛋白质或细胞外基质组分。其他潜在的基质是不可生物降解的且化学上定义的，包括例如烧结的羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其他陶瓷。基质可以包括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和磷酸三钙。可以改变生物陶瓷的组成(例如，钙-铝酸盐-磷酸盐)和加工以改变孔径、粒度、粒子形状和生物降解性中的一种或多种。

[0395] 在某些实施方案中，本公开文本的药物组合物可以局部地给予。“局部施用”或“局部地”意指药物组合物与体表(包括例如皮肤、伤口部位和粘膜)接触。局部药物组合物可以具有多种施用形式，并且通常包含含药物层，其适合于在局部给予所述组合物时放置在组织附近或与组织直接接触。适合于局部给予的药物组合物可以包含组合地配制成液体、凝胶、乳膏、洗剂、软膏、泡沫、糊剂、油灰(putty)、半固体或固体的本公开文本的一种或多种BMP拮抗剂。呈液体、凝胶、乳膏、洗剂、软膏、泡沫、糊剂或油灰形式的组合物可以通过在目标组织上摊开、喷涂、涂抹、轻搽或滚动所述组合物来施用。所述组合物还可以浸渍至无菌敷料、透皮贴剂、膏药和绷带中。油灰、半固体或固体形式的组合物可以是可变形的。它们可以是弹性的或非弹性的(例如，柔性或刚性的)。在某些方面，所述组合物形成复合材料的一部分并且可以包括纤维、微粒或具有相同或不同组成的多个层。

[0396] 呈液体形式的局部组合物可以包括药学上可接受的溶液、乳液、微乳液和悬浮液。除了一种或多种活性成分之外，液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂，包括例如水或其他溶剂、增溶剂和/或乳化剂[例如，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇或1,3-丁二醇、油(例如，棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇、脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物]。

[0397] 局部凝胶、乳膏、洗剂、软膏、半固体或固体组合物可以包含一种或多种增稠剂，如多糖、合成聚合物或基于蛋白质的聚合物。在本发明的一个实施方案中，本文的胶凝剂是合适的无毒并且提供所需粘度的胶凝剂。增稠剂可以包括以下的聚合物、共聚物和单体：乙烯吡咯烷酮、甲基丙烯酰胺、丙烯酰胺N-乙烯基咪唑、羧基乙烯基、乙烯基酯、乙烯基醚、聚硅酮、聚氧化乙烯、聚乙二醇、乙烯醇、丙烯酸钠、丙烯酸酯、马来酸、NN-二甲基丙烯酰胺、双丙酮丙烯酰胺、丙烯酰胺、丙烯酰基吗啉、普朗尼克、胶原、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯基撑、聚乙烯硅酸酯、用糖(例如，蔗糖、葡萄糖、葡糖胺、半乳糖、海藻糖、甘露糖或乳糖)取代的聚丙烯酸酯、酰基酰胺丙烷磺酸、四甲氧基正硅酸酯、甲基三甲氧基正硅酸酯、四烷氧基正硅酸酯、三烷氧基正硅酸酯、二醇、丙二醇、丙三醇、多糖、海藻酸酯、葡聚糖、环糊精、纤维素、改性纤维素、氧化纤维素、壳聚糖、几丁质、瓜尔胶、角叉菜胶、透明质酸、菊粉、淀粉、改性淀粉、琼脂糖、甲基纤维素、植物胶、hylaronan、水凝胶、明胶、葡糖氨基葡聚糖、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、果胶、低甲氧基果胶、交联葡聚糖、淀粉-丙烯腈接枝共聚物、淀粉聚丙烯酸钠、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、聚乙烯基撑、聚乙烯基乙醚、聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯、聚氨酯、聚链烷酸酯、聚乳酸、聚乳酸酯、聚

(3-羟基丁酸酯)、磺化水凝胶、AMPS(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、SEM(甲基丙烯酸磺乙酯)、SPM(甲基丙烯酸磺丙酯)、SPA(丙烯酸磺丙酯)、N,N-二甲基-N-甲基丙烯酸氧乙基-N-(3-磺丙基)铵甜菜碱、甲基丙烯酸酰胺基丙基-二甲基铵磺基甜菜碱、SPI(衣康酸-双(1-丙基磺酸-3)酯二钾盐)、衣康酸、AMBC(3-丙烯酰胺基-3-甲基丁酸)、β-羧乙基丙烯酸酯(丙烯酸二聚体)以及马来酸酐-甲基乙烯醚聚合物、其衍生物、其盐、其酸及其组合。在某些实施方案中,本公开文本的药物组合物可以口服地给予,例如以下列形式:胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质如蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉末、颗粒、在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液、水包油或油包水液体乳液或酏剂或糖浆或软锭剂(使用惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口水,每一种均含有预定量的本公开文本的化合物和任选的一种或多种其他活性成分。本公开文本的化合物和任选的一种或多种其他活性成分也能以大丸药、药糖剂或糊剂给予。

[0398] 在用于口服给予的固体剂型(例如,胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末和颗粒)中,本公开文本的一种或多种化合物可以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、磷酸二钙、填料或增量剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸)、粘合剂(例如,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、保湿剂(例如,甘油)、崩解剂(例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或树薯淀粉、海藻酸、硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如,石蜡)、吸收促进剂(例如,季铵化合物)、润湿剂(例如,鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)、吸收剂(例如,高岭土和膨润土)、润滑剂(例如,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,药物配制品(组合物)也可以包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可以用作使用包括例如乳糖(“lactose”或“milk sugar”)以及高分子量聚乙二醇在内的一种或多种赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0399] 用于口服给予药物组合物的液体剂型可以包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了一种或多种活性成分之外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂,包括例如水或其他溶剂、增溶剂和/或乳化剂[例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇或1,3-丁二醇、油(例如,棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇、脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物]。除惰性稀释剂外,口服配制品还可以包含佐剂,包括例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂、防腐剂及其组合。

[0400] 除活性化合物外,悬浮液可以含有悬浮剂,包括例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇、脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂、黄蓍胶及其组合。

[0401] 通过包含多种抗细菌剂和抗真菌剂(包括例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇和苯酚山梨酸)可以确保防止微生物的作用和/或生长。

[0402] 在某些实施方案中,可能需要在所述组合物中包含等渗剂,包括例如糖或氯化钠。另外,通过包含延迟吸收的试剂(包括例如单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0403] 应当理解,剂量方案将由主治医师通过考虑改变本公开文本的一种或多种药剂的作用的多种因素来确定。在促进红细胞形成的BMP拮抗剂的情况下,多种因素可以包括但不限于患者的红细胞计数、血红蛋白水平、期望的目标红细胞计数、患者的年龄、患者的性别、

患者的饮食、可能有助于红细胞水平下降的任何疾病的严重程度、给予时间和其他临床因素。向最终组合物中添加其他已知的活性剂也可能影响剂量。可以通过定期评估红细胞水平、血红蛋白水平、网织红细胞水平和造血过程的其他指示物中的一种或多种来监测进展。

[0404] 在某些实施方案中，本公开文本还提供了用于体内产生本公开文本的一种或多种药剂的基因疗法。这种疗法将通过将药剂序列引入具有以上列出的一种或多种障碍的细胞或组织中来实现其治疗作用。例如，通过使用重组表达载体如嵌合病毒或胶体分散系统，可以实现药剂序列的递送。本公开文本的一种或多种药剂序列的优选治疗性递送是靶向脂质体的使用。

[0405] 如本文所传授的可用于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(例如，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。可以插入单个外源基因的逆转录病毒载体的例子包括但不限于：莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus，MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus，HaMuSV)、鼠乳腺瘤病毒(MuMTV)和劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus，RSV)。许多另外的逆转录病毒载体可以掺入多种基因。所有这些载体都可以转移或掺入可选择的标记的基因，使得可以鉴定和产生转导的细胞。逆转录病毒载体可以通过附着例如糖、糖脂或蛋白质而成靶特异性的。优选的靶向通过使用抗体来完成。本领域技术人员将认识到，可以将特定多核苷酸序列插入逆转录病毒基因组中或附着于病毒包膜，以允许含有本公开文本的一种或多种药剂的逆转录病毒载体的靶特异性递送。

[0406] 可替代地，可以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)的质粒直接转染组织培养细胞。然后用含有所关注基因的载体质粒转染这些细胞。所得细胞将逆转录病毒载体释放到培养基中。

[0407] 用于本公开文本的一种或多种药剂的另一种靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、心脏瓣膜病粒和基于脂质的系统，其包括水包油乳液、胶团、混合胶团和脂质体。在某些实施方案中，本公开文本的优选胶体系统是脂质体。脂质体是人工膜囊泡，其在体外和体内可用作递送媒介物。可以将RNA、DNA和完整病毒粒子包封于水性内部内，并以生物活性形式递送至细胞[Fraley等人(1981)Trends Biochem.Sci.,6:77]。使用脂质体运载体的有效基因转移方法是本领域已知的[Mannino等人(1988)Biotechniques,6:682,1988]。

[0408] 脂质体的组成通常是磷脂的组合，所述磷脂可以包括类固醇(例如胆固醇)。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。也可以使用其他磷脂或其他脂质，包括例如磷脂酰化合物(例如，磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂)、卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。基于例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性，脂质体的靶向也是可能的，并且是本领域已知的。

[0409] 实施例

[0410] 现在一般性地描述本发明，通过参考以下实施例将更容易地理解本发明，所述实施例仅用于说明本发明的某些实施方案和实施方案的目的而被包括在内，并不旨在限制本发明。

[0411] 实施例1:ActRIIa-Fc融合蛋白

[0412] 生成了ActRIIA融合蛋白，其具有与人或小鼠Fc结构域融合的人ActRIIA的细胞外结构域，二者之间具有接头。将构建体分别称为ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc。

[0413] ActRIIA-hFc在下文中显示为从CHO细胞系中纯化(SEQ ID NO:50)：

[0414] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白是在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列：

[0415] (i)蜜蜂蜂毒肽(HBML)：MKFLVNVALVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:51)

[0416] (ii)组织型纤溶酶原激活物(TPA)：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:52)

[0417] (iii)天然的：MGAAAKLAFAVFLISCSSGA(SEQ ID NO:53)。

[0418] 所选择的形式使用TPA前导序列并具有以下未加工的氨基酸序列：

[0419] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:54)

[0420] 这种多肽是由以下核酸序列编码：

[0421] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC(SEQ ID NO:55)

[0422] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc都非常适合于重组表达。将蛋白质纯化为单一的、界限清楚的蛋白质峰。N末端测序揭示了-ILGRSETQE的单个序列(SEQ ID NO:56)。可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化，包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种：蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交

换完成纯化。将ActRIIA-hFc蛋白纯化至纯度>98％(如通过尺寸排阻色谱所测定的)和>95％(如通过SDS PAGE所测定的)。

[0423] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc显示出对多种配体的高亲和力。使用标准胺偶联程序将配体固定在Biacore™ CM5芯片上。将ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白加载至系统上,并且测量结合。ActRIIA-hFc与多种配体结合,包括例如以3.33x 10^{-10}M的解离常数(K_D)与BMP10结合、以1.04x 10^{-8}M的K_D与BMP9结合、以5.56x 10^{-10}M的K_D与BMP6结合以及以1.14x 10^{-9}M的K_D与BMP5结合。ActRIIA-mFc表现相似。

[0424] 可以根据本文所述的方法使用的各种ActRIIA变体被描述于公开为WO2006/012627和WO 2007/062188的国际专利申请中,将所述申请通过引用以其全文并入本文。替代构建体可以具有C末端尾部(ActRIIA的细胞外结构域的最后15个氨基酸)的缺失。这种构建体的序列呈现于下文中(Fc部分加下划线)(SEQ ID NO:57):

[0425] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0426] 实施例2:ActRIIB-Fc融合蛋白的产生

[0427] 构建了ActRIIB融合蛋白,其具有与人或小鼠Fc结构域融合的人ActRIIB的细胞外结构域,二者之间具有接头。将构建体分别称为ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc。

[0428] ActRIIB-hFc在下文中显示为从CHO细胞系中纯化(SEQ ID NO:58):GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0429] ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc蛋白是在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列:(i)蜜蜂蜂毒肽(HBML)、ii)组织型纤溶酶原激活物(TPA)和(iii)天然的:MGAAAKLAFAVFLISCSSGA(SEQ ID NO:59)。

[0430] 所选择的形式使用TPA前导序列并具有以下未经加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:60):

[0431] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0432] 此多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:61)编码:

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
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
ACCCCCGACA GCCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA
CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT

[0433] GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG
TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
AAATGA

[0434] CHO细胞产生的材料的N末端测序揭示了-GRGEAE的主要序列(SEQID NO:62)。值得注意的是,文献中报告的其他构建体以-SGR…序列开始。

[0435] 可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。

[0436] ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc显示出对多种配体的高亲和力。使用标准胺偶联程序将配体固定在Biacore™ CM5芯片上。将ActRIIB-hFc和ActRIIB-mFc蛋白加载至系统上,并测量结合。ActRIIB-hFc与多种配体结合,包括例如以1.73x 10^{-11}M的解离常数(K_D)与BMP10结合、以3.35x 10^{-11}M的K_D与BMP9结合、以1.64x 10^{-10}M的K_D与BMP6结合以及以2.92x 10^{-9}M的K_D与BMP5结合。ActRIIB-mFc表现相似。

[0437] 在ActRIIB的细胞外结构域中生成一系列突变,并且这些突变蛋白作为ActRIIB的变体细胞外结构域与Fc结构域之间的可溶性融合蛋白产生。背景ActRIIB-Fc融合物具有

SEQ ID NO:58的序列。将多种突变(包括N末端和C末端截短)引入背景ActRIIB-Fc蛋白中。基于本文呈现的数据,预期这些构建体如果与TPA前导序列一起表达,则将缺乏N末端丝氨酸。在ActRIIB细胞外结构域中通过PCR诱变产生突变。在PCR后,将片段通过Qiagen柱纯化,用SfoI和AgeI消化并进行凝胶纯化。将这些片段连接到表达载体pAID4(参见WO 2006/012627)中,以使得在连接后它产生与人IgG1的融合嵌合体。在转化到大肠杆菌DH5α中后,挑取菌落并分离DNA。对于鼠构建体(mFc),用鼠IgG2a取代人IgG1。验证了所有突变体的序列。所有突变体都是在HEK293T细胞中通过瞬时转染产生的。总而言之,在500ml旋转器中,将HEK293T细胞以6x 10^5个细胞/ml设置于250ml体积的Freestyle(Invitrogen)培养基中并生长过夜。第二天,用DNA:PEI(1:1)复合物以0.5ug/ml最终DNA浓度处理这些细胞。在4小时后,添加250ml培养基并使细胞生长7天。通过旋转沉降细胞来收获条件培养基并浓缩。使用多种技术(包括例如蛋白质A柱)纯化突变体,并用低pH(3.0)甘氨酸缓冲液洗脱。在中和后,将这些突变体用PBS透析。也在CHO细胞中通过类似方法产生突变体。在通过引用并入本文的WO 2008/097541和WO 2006/012627中描述的结合测定和/或生物测定中测试了突变体。在一些情况下,用条件培养基而不是纯化的蛋白质进行测定。ActRIIB的其他变异描述于美国专利号7,842,663中。

[0438] 包含具有N末端和C末端截短的人ActRIIB细胞外结构域(天然蛋白SEQID NO:1的残基25-131)的ActRIIB(25-131)-hFc融合蛋白经由接头(图5;SEQ ID NO:123)在N末端与取代天然ActRIIB前导序列的TPA前导序列融合并且在C末端与人Fc结构域融合。编码此融合蛋白的核苷酸序列示于图6中(SEQ ID NO:124编码链和SEQ ID NO:125互补链)。修饰密码子,并发现编码ActRIIB(25-131)-hFc蛋白的变体核酸提供融合蛋白的表达水平的明显改善(图7;SEQ ID NO:126编码链和SEQ ID NO:127互补链)。

[0439] 成熟蛋白具有如下氨基酸序列(通过N末端测序确认的N末端)(SEQ ID NO:63):

[0440] ETRECIYYNANWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

[0441] KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

[0442] TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

[0443] VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

[0444] WLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ

[0445] VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

[0446] DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

[0447] 氨基酸1-107衍生自ActRIIB。

[0448] 可以使用一系列柱色谱步骤纯化表达的分子,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。

[0449] 使用Biacore™仪器在体外评价几种配体对于ActRIIB(25-131)-hFc的亲和力。使用标准胺偶联程序将配体固定在Biacore™ CM5芯片上。将ActRIIB(25-131)-hFc加载至系统上,并测量结合。ActRIIB(25-131)-hFc与多种配体结合,包括例如以5.5x 10^{-11}M的解离常数(K_D)与BMP10结合、以3.2x10^{-10}M的K_D与BMP9结合、以1.46x 10^{-10}M的K_D与BMP6结合以及以2.19x10^{-8}M的K_D与BMP5结合。

[0450] 将在SEQ ID NO:1中的位置79处具有亮氨酸到天冬氨酸取代的ActRIIB(20-134)

的变体与Fc结构域融合，二者之间具有接头。所述构建体称为ActRIIB(L79D 20-134)-hFc。在位置79处具有谷氨酸而不是天冬氨酸的替代形式在结合测定中类似地(L79E)进行。下面还生成了在关于SEQ ID NO:64的位置226处具有丙氨酸而不是缬氨酸的替代形式，并且所述替代形式在所有测试方面等效地进行。位置79(相对于SEQ ID NO:1，或相对于SEQ ID NO:64的位置60)处的天冬氨酸在下文中是通过加双下划线来指示。在相对于SEQ ID NO:64的位置226处的缬氨酸也是在下文中通过加双下划线来指示。

[0451] ActRIIB(L79D 20-134)-hFc如下所示，为从CHO细胞系纯化的(SEQ ID NO:64)。

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE
AGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

[0452] TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0453] ActRIIB(L79D 20-134)-hFc的ActRIIB衍生部分具有如下所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:65)，所述部分可以用作单体或以单体、二聚体或更高阶复合物形式的非Fc融合蛋白。

[0454] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT(SEQ ID NO:65)

[0455] 使ActRIIB(L79D 20-134)-hFc融合蛋白在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列：

[0456] (i)蜜蜂蜂毒肽(HBML)、(ii)组织型纤溶酶原激活物(TPA)和(iii)天然的。

[0457] 所选择的形式使用TPA前导序列并具有以下未加工的氨基酸序列：

[0458] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:66)

[0459] 此多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:67)编码：

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA

[0460] GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG

[0461]
GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
ACCCCCGACA GCCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA
CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG
TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
AAATGA

[0462] 可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。在纯化方案的例子中,使细胞培养基经过蛋白质A柱,在150mM Tris/NaCl(pH 8.0)中洗涤,然后在50mM Tris/NaCl(pH 8.0)中洗涤,并用0.1M甘氨酸(pH 3.0)洗脱。将低pH洗脱物在室温下保持30分钟作为病毒清除步骤。然后中和洗脱物并使其经过Q琼脂糖离子交换柱并在50mM Tris(pH 8.0)、50mM NaCl中洗涤,并在50mM Tris(pH 8.0)中洗脱,其中NaCl浓度介于150mM与300mM之间。然后将洗脱物交换至50mM Tris(pH 8.0)、1.1M硫酸铵中,并使其经过苯基琼脂糖柱,洗涤,并在50mM Tris(pH 8.0)中洗脱,其中硫酸铵介于150与300mM之间。对洗脱物进行透析和过滤以供使用。

[0463] 将在SEQ ID NO:1中的位置79处具有亮氨酸到天冬氨酸取代的ActRIIB(25-131)的变体与Fc结构域融合,二者之间具有接头。包含TPA前导序列的构建体描绘于图8中(SEQ ID NO:131)。ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的细胞纯化形式的序列示于图9中(SEQ ID NO:132),并且不含前导序列、接头或Fc结构域的成熟细胞外结构域示于图10中(SEQ ID NO:133)。编码此融合蛋白的一个核苷酸序列(SEQ ID NO:134)及其互补序列(SEQ ID NO:135)示于图11中,并且编码完全相同的融合蛋白的替代核苷酸序列(SEQ ID NO:136)及其互补序列(SEQ ID NO:137)示于图12中。

[0464] 使用Biacore™仪器在体外评价几种配体对于ActRIIB(L79D 25-131)-hFc的亲和力。使用标准胺偶联程序将配体固定在Biacore™ CM5芯片上。将ActRIIB(L79D 25-131)-hFc加载至系统上，并测量结合。ActRIIB(L79D25-131)-hFc与多种配体结合，包括例如以1.56x 10^{-10}M的解离常数(K_D)与BMP10结合和以1.79x 10^{-10}M的K_D与BMP6结合。ActRIIB(L79D25-131)-hFc仅对于BMP9具有短暂的亲和力，而对于BMP5没有可检测到的结合亲和力。ActRIIB(L79D 25-131)-mFc表现相似。

[0465] 实施例3.BMPRII-Fc融合蛋白的生成

[0466] 生成了同二聚体BMPRII-Fc融合蛋白，其包含与人免疫球蛋白G1Fc结构域以接头融合的人BMPRII的细胞外结构域。与BMPRII-Fc融合多肽一起使用的前导序列包括天然人BMPRII前体前导序列MTSSLQRPWRVPWLPWTILLVSTAAA(SEQ ID NO:68)和组织纤溶酶原激活剂(TPA)前导序列。

[0467] 具有TPA前导序列的人BMPRII-Fc多肽序列(SEQ ID NO:69)如下所示：

[0468]
```
  1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASQNQER LCAFKDPYQQ DLGIGESRIS
 51   HENGTILCSK GSTCYGLWEK SKGDINLVKQ GCWSHIGDPQ ECHYEECVVT
101   TTPPSIQNGT YRFCCCSTDL CNVNFTENFP PPDTTPLSPP HSFNRDETGG
151   GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
201   EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
251   KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
301   FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
351   VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK     (SEQ ID NO: 69)
```

[0469] 前导序列和接头加下划线。SEQ ID NO:69的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0470] 此BMPRII-Fc融合蛋白由以下核酸序列(SEQ ID NO:70)编码：

```
   1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  51   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCGCAGAA TCAAGAACGC CTATGTGCGT
 101   TTAAAGATCC GTATCAGCAA GACCTTGGGA TAGGTGAGAG TAGAATCTCT
 151   CATGAAAATG GGACAATATT ATGCTCGAAA GGTAGCACCT GCTATGGCCT
 201   TTGGGAGAAA TCAAAAGGGG ACATAAATCT TGTAAAACAA GGATGTTGGT
 251   CTCACATTGG AGATCCCCAA GAGTGTCACT ATGAAGAATG TGTAGTAACT
 301   ACCACTCCTC CCTCAATTCA GAATGGAACA TACCGTTTCT GCTGTTGTAG
 351   CACAGATTTA TGTAATGTCA ACTTTACTGA GAATTTTCCA CCTCCTGACA
 401   CAACACCACT CAGTCCACCT CATTCATTTA ACCGAGATGA GACCGGTGGT
 451   GGAACTCACA CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC
 501   GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
[0471] 551   GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
 601   GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
 651   GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG
 701   TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
 751   AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA
 801   AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
 851   GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
 901   TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA
 951   GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT
1001   TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1051   GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
1101   GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAA    (SEQ ID NO: 70)
```

[0472] 加工的BMPRII-Fc融合多肽(SEQ ID NO:71)是如下,并且可以任选地提供为从C末端除去赖氨酸。

```
   1   SQNQERLCAF KDPYQQDLGI GESRISHENG TILCSKGSTC YGLWEKSKGD
[0473] 51   INLVKQGCWS HIGDPQECHY EECVVTTTPP SIQNGTYRFC CCSTDLCNVN
 101   FTENFPPPDT TPLSPPHSFN RDETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
```

[0474]

```
151   KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
201   YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
251   PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP
301   PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
351   GK      (SEQ ID NO: 71)
```

[0475] 此BMPRII-Fc融合蛋白由以下核酸序列(SEQ ID NO:72)编码：

[0476]

```
  1   TCGCAGAATC AAGAACGCCT ATGTGCGTTT AAAGATCCGT ATCAGCAAGA
 51   CCTTGGGATA GGTGAGAGTA GAATCTCTCA TGAAAATGGG ACAATATTAT
101   GCTCGAAAGG TAGCACCTGC TATGGCCTTT GGGAGAAATC AAAAGGGGAC
151   ATAAATCTTG TAAAACAAGG ATGTTGGTCT CACATTGGAG ATCCCCAAGA
201   GTGTCACTAT GAAGAATGTG TAGTAACTAC CACTCCTCCC TCAATTCAGA
251   ATGGAACATA CCGTTTCTGC TGTTGTAGCA CAGATTTATG TAATGTCAAC
301   TTTACTGAGA ATTTTCCACC TCCTGACACA ACACCACTCA GTCCACCTCA
351   TTCATTTAAC CGAGATGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT
401   GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA
451   AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT
501   GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG
551   TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG
601   TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA
651   CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC
701   CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
751   CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA
801   GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
851   TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
901   CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT
951   GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
1001  ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
1051  GGTAAA     (SEQ ID NO: 72)
```

[0477] 可以由CHO细胞系表达SEQ ID NO:71的BMPRII-Fc融合多肽并从CHO细胞系纯化，以产生同二聚体BMPRII-Fc融合蛋白质复合物。

[0478] 各种BMPRII-Fc复合物的纯化可以通过一系列柱色谱步骤实现，包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种：蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。

[0479] 使用基于Biacore™的结合测定来确定上述BMPRII-Fc蛋白质复合物的配体结合选择性。使用抗Fc抗体将BMPRII-Fc同二聚体捕获到系统上，注射配体并使其流经捕获的受体蛋白。结果归纳于下表中。

[0480]

BMPRII-Fc同二聚体的配体结合特征			
配体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
BMP10	2.6×10^7	2.5×10^{-3}	100
BMP9	1.2×10^7	2.6×10^{-2}	2100
BMP6	短暂*		8900
*由于相互作用的短暂性质而不确定			

[0481] 这些配体结合数据证明同二聚体BMPRII-Fc融合蛋白以高皮摩尔亲和力与BMP10结合，并且以大约十倍低的亲和力与BMP9结合。作为配体陷阱，BMPRII-Fc多肽应优选地展现出缓慢的配体解离速率，因此特别期望观察到对于BMP10的解离速率。出人意料的是，尽管文献表明BMPRII充当经典BMP蛋白(如BMP2、BMP4、BMP6或BMP7)的主要II型受体，但BMPRII-Fc融合蛋白显示与BMP2、BMP4、BMP6或BMP7中的任何一种没有明显结合。因此，同二聚体BMPRII-Fc可用于其中BMP10和BMP9的拮抗作用有利的某些治疗应用中。

[0482] 实施例4:ALK1-Fc融合蛋白

[0483] 生成了ALK1融合蛋白，其具有与人Fc融合的人ALK1或与鼠Fc结构域融合的小鼠ALK1的细胞外结构域，二者之间具有接头。所述构建体分别称为ALK1-hFc和mALK1-mFc。

[0484] 值得注意的是，虽然人ALK1蛋白的细胞外结构域的常规C末端是SEQID NO:20的氨基酸118，但我们已经确定希望避免具有以谷氨酰胺残基结束的结构域。因此，衍生自人ALK1的SEQ ID NO:76的部分将两个残基即亮氨酸和丙氨酸掺入Q118的C末端。因此，本公开文本提供了具有ALK1衍生序列的C末端的ALK1ECD多肽(包括Fc融合蛋白)，所述C末端在Q118的上游(关于SEQ ID NO:20的113-117)或下游(119-123)的1至5个氨基酸的任何地方。

[0485] 使ALK1-hFc和ALK1-mFc蛋白在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列：(i)蜜蜂蜂毒肽(HBML)，(ii)组织纤溶酶原激活剂(TPA)和天然的:MTLGSPRKGLLMLLMALVTQG(SEQ ID NO:73)。

[0486] 选择的ALK1-hFc形式使用TPA前导序列，并且具有如下所示未加工的氨基酸序列：

[0487] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGADPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQLATGGGTHTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:74)

[0488] ALK1细胞外结构域是加下划线的。

[0489] 从CHO细胞系纯化的ALK1-hFc如下所示：

[0490] DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYC

CDSHLCNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQLATGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:76)

[0491] 可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。将ALK1-hFc蛋白纯化至如通过尺寸排阻色谱所测定的>98%的纯度,和如通过SDSPAGE所测定的>95%的纯度。

[0492] 使用Biacore™仪器在体外评价几种配体对于ALK1-hFc的亲和力。使用标准胺偶联程序将多种配体固定在Biacore™ CM5芯片上。将ALK1-hFc加载至系统上,并测量结合。ALK1-hFc以1.49x 10^{-11}M的解离常数(K_D)与BMP10结合和以3.14x 10^{-11}M的K_D与BMP9结合。ALK1-hFc对于BMP5或BMP6没有可检测到的结合亲和力。ALK1-mFc表现相似。

[0493] 实施例5:ENG-Fc融合蛋白的生成

[0494] 内皮糖蛋白(ENG)融合蛋白[hENG(26-586)-hFc],其中将人ENG的全长细胞外结构域(ECD)(SEQ ID NO:24的氨基酸26-586)附接至人IgG1Fc结构域,其中在这些结构域之间具有接头。

[0495] 考虑了三种不同的前导序列:(i)蜜蜂蜂毒肽(HBML),(ii)组织纤溶酶原激活剂(TPA),和(iii)天然的人ENG:MDRGTLPLAVALLLASCSLSPTSLA(SEQ ID NO:77)

[0496] 所选形式的hENG(26-586)-hFc使用TPA前导序列,具有如下所示的未加工的氨基酸序列:

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
401 KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
451 LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG
501 GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV
551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISPDLSG CTSKGTGGGP KSCDKTHTCP
601 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
651 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
701 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
751 AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
801 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK    (SEQ ID NO: 78)
```

[0497]

[0498] ENG细胞外结构域用单下划线表示;TPA前导序列用双下划线表示。上面描述的hENG(26-586)-hFc由如下所示的核苷酸序列编码:

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
     GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
 201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
     CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
     GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
     GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
     AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
     GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
     ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
     AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
     GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
     CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACGACGCCAT
1101 GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTTGC GCATTTGAAG TGCACCATCA
     CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201 AAGTTTGTCT TGCGCAGTGC TTACTCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
     AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTCG AGCTCATCAC
1301 CACAGCGGAA AAAGGTGCAC TGCCTCAACA TGGACAGCCT CTCTTTCCAG
     CTGGGCCTCT ACCTCAGCCC ACACTTCCTC CAGGCCTCCA ACACCATCGA
1401 GCCGGGGCAG CAGAGCTTTG TGCAGGTCAG AGTGTCCCCA TCCGTCTCCG
```

[0499]

AGTTCCTGCT CCAGTTAGAC AGCTGCCACC TGGACTTGGG GCCTGAGGGA

1501 GGCACCGTGG AACTCATCCA GGGCCGGGCG GCCAAGGGCA ACTGTGTGAG

CCTGCTGTCC CCAAGCCCCG AGGGTGACCC GCGCTTCAGC TTCCTCCTCC

1601 ACTTCTACAC AGTACCCATA CCCAAAACCG GCACCCTCAG CTGCACGGTA

GCCCTGCGTC CCAAGACCGG GTCTCAAGAC CAGGAAGTCC ATAGGACTGT

1701 CTTCATGCGC TTGAACATCA TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT TGCACAAGCA

AAGGCACCGG TGGTGGACCC AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA

1801 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC

CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT

1901 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG

[0500] TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA

2001 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC

AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC

2101 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG

AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA

2201 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC

GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC

2301 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA

CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG

2401 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC

CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 79)

[0501] ENG细胞外结构域用单下划线表示;TPA前导序列用双下划线表示。

[0502] 还设想了具有TPA前导序列的替代hENG(26-586)-hFc序列,其包含通过T接头附接至hENG(26-586)的N末端截短hFc结构域:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK

51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV

101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA

[0503] 151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP

201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL

251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG

301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS

[0504]

351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD

401 KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ

451 LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG

501 GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV

551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISPDLSG CTSKGTGGGT HTCPPCPAPE

601 LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE

651 VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE

701 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES

751 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH

801 NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 80)

[0505] 使用多种技术实现纯化，所述技术包括例如过滤条件培养基、接着进行蛋白A色谱、用低pH(3.0)甘氨酸缓冲液洗脱、样品中和以及针对PBS的透析。通过分析尺寸排阻色谱、SDS-PAGE、银染色和Western印迹评价样品的纯度。成熟蛋白的分析确认了预期的N末端序列。

[0506] 普遍认为共受体ENG通过促进TGF-β1和-3与I型和II型受体的多蛋白质复合物的结合而起作用。为了研究通过分离的ENG进行直接配体结合的可能性，使用表面等离子体共振(SPR)方法(Biacore™仪器)针对包含ENG的全长细胞外结构域的捕获蛋白与多种可溶性人TGF-β家族配体的结合进行筛选。

[0507]

配体	构建体结合	
	hENG（26-586）-hFc*	hENG（26-586）**
hBMP-2	–	–
hBMP-2/7	–	–
hBMP-7	–	–
hBMP-9	++++	++++
hBMP-10	++++	++++
hTGF-β1	–	–
hTGF-β2	–	–
hTGF-β3	–	–
hActivin A	–	–

[0508] *[hBMP-9]、[hBMP-10]＝2.5nM;所有其他配体在100nM下测试

[0509] **[hBMP-9]、[hBMP-10]＝2.5nM;所有其他配体在25nM下测试

[0510] 如此表所示，如在低配体浓度下所评价的，hBMP9和hBMP10对于hENG(26-586)-hFc

的结合亲和力是高的(++++,K_D<1nM)。即使浓度高40倍,TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、激活素A、BMP2和BMP7与hENG(26-586)-hFc的结合也是不可检测的(-)。对于后一组配体,与分离的ENG融合蛋白的直接结合的缺乏是值得注意的,因为已显示I型和II型受体的多蛋白质复合物在ENG的存在下比在其不存在的情况下更好地结合它们中的大多数。还如上表所示,当针对配体与固定化hENG(26-586)(R&D Systems,目录号1097-EN)即没有Fc结构域的人变体结合的能力筛选配体时,获得了类似的结果。通过SPR表征确定捕获的hENG(26-586)-hFc以29pM的K_D结合可溶性BMP9和以400pM的K_D结合可溶性BMP10。因此,BMP9和BMP10的选择性高亲和力结合是ENG细胞外结构域的先前未识别的特性。

[0511] 生成了ENG融合蛋白,其中人ENG ECD的截短变体与人IgG_1Fc结构域融合,二者之间具有接头。下面列出了这些变体,并且在图13中示意性地显示了所选变体的结构。

[0512]

	人构建体	瞬时表达	纯化的	稳定表达(CHO细胞)
全长	hENG(26-586)-hFc	HEK 293	是	是
羧基末端截短物	hENG(26-581)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26-437)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26-378)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26-359)-hFc	HEK 293	是	是
	hENG(26-346)-hFc	HEK 293	是	是
	hENG(26-332)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26-329)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26-257)-hFc	HEK 293	是	否
氨基末端截短物	hENG(360-586)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(438-586)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(458-586)-hFc	COS	否	否
双截短物	hENG(61-346)-hFc	HEK 293	是	否

[0513]

	hENG(129-346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(133-346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(166-346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(258-346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(360-581)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(360-457)-hFc	COS	否	否
	hENG(360-437)-hFc	COS	否	否
	hENG(458-581)-hFc	COS	否	否

[0514] 如所指示的，通过在HEK 293细胞或COS细胞中瞬时转染来表达这些变体。

[0515] SPR方法用于针对与人BMP9和BMP10的高亲和力结合筛选这些hENG-hFc蛋白变体。在这些实验中，将捕获的hENG-hFc蛋白暴露于各自100nM下的可溶性BMP9或BMP10中。

[0516]

	人构建体	与hBMP9和hBMP10的结合
全长	hENG(26-586)-hFc	++++
羧基末端截短物	hENG(26-581)-hFc	++++
	hENG(26-437)-hFc	++++
	hENG(26-378)-hFc	++++
	hENG(26-359)-hFc	++++
	hENG(26-346)-hFc	++++
	hENG(26-332)-hFc	–
	hENG(26-329)-hFc	–
	hENG(26-257)-hFc	–
氨基末端截短物	hENG(360-586)-hFc	–
	hENG(438-586)-hFc	–
	hENG(458-586)-hFc	–
双截短物	hENG(61-346)-hFc	–
	hENG(129-346)-hFc	–
	hENG(133-346)-hFc	–
	hENG(166-346)-hFc	–

[0517]

	hENG(258-346)-hFc	–
	hENG(360-581)-hFc	–
	hENG(360-457)-hFc	–
	hENG(360-437)-hFc	–
	hENG(458-581)-hFc	–

[0518] ++++KD<1nM

[0519] -未检测到的结合

[0520] 如上表所示,仅对于全长构建体和对于短至hENG(26-346)-hFc的C末端截短变体观察到与BMP9和BMP10的高亲和力结合。对于所测试的大于61个氨基酸的所有N末端截短物,丧失了与BMP9和BMP10的高亲和力结合。

[0521] 针对与C末端截短变体hENG(26-346)-hFc、hENG(26-359)-hFc和hENG(26-437)-hFc的潜在结合筛选一组配体。这三种蛋白质的高亲和力结合对于BMP9和BMP10具有选择性。hENG(26-346)-hFc、hENG(26-359)-hFc和hENG(26-437)-hFc均未显示出与BMP2、BMP7、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3或激活素A的可检测结合,即使在高配体浓度下也是如此。

[0522]

配体	构建体结合		
	hENG（26-346）-hFc*	hENG（26-359）-hFc**	hENG（26-437）-hFc**
hBMP-2	–	–	–
hBMP-2/7	–	–	–
hBMP-7	–	–	–
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF-β1	–	–	–
hTGF-β2	–	–	–
hTGF-β3	–	–	–
hActivin A	–	–	–

[0523] *[hBMP-9]、[hBMP-10]＝5nM;[hTGF-β3]＝50nM;所有其他配体在100nM下测试

[0524] **[hBMP-9]、[hBMP-10]＝5nM;[hTGF-β3]＝50nM;所有其他配体在100nM下测试

[0525] ++++KD<1nM

[0526] -未检测到的结合

[0527] SPR方法用于比较以下五种构建体对BMP9结合的动力学:hENG(26-586)-hFc、hENG(26-437)-hFc、hENG(26-378)-hFc、hENG(26-359)-hFc和hENG(26-346)-hFc。人BMP-9对于hENG(26-359)-hFc或hENG(26-346)-hFc的亲和力(K_D在低皮摩尔范围内)几乎比对于全长

构建体的亲和力强一个数量级。非常期望配体陷阱如ENG-Fc展现出相对缓慢的配体解离速率，因此特别值得注意的是与全长构建体相比hENG(26-346)-hFc的BMP9解离速率改善(降低)十倍。

[0528]

配体	构建体	K_D (x 10^{-12} M)	k_d (x 10^{-4} s^{-1})
hBMP-9	hENG (26-586) -hFc *	33	25
	hENG(26-437)-hFc **	19	14
	hENG(26-378)-hFc **	6.7	3.4
	hENG (26-359) -hFc *	4.2	3.5
	hENG (26-346) -hFc *	4.3	2.4

[0529] *CHO细胞衍生的蛋白质

[0530] **HEK293细胞衍生的蛋白质

[0531] 如下所示，与全长构建体相比，每个截短变体还以更高的亲和力并且以更好的动力学结合BMP10。即便如此，截短变体对于BMP9优于BMP10的偏好程度不同(基于K_D比率)，其中hENG(26-346)-hFc显示最大差异，而hENG(26-437)-hFC差异最小。截短变体中配体偏好的程度的这种差异可能潜在地转化为它们在体内活性的有意义的差异。

[0532]

配体	构建体	K_D (x 10^{-12} M)	k_d (x 10^{-4} s^{-1})
hBMP-10	hENG (26-586) -hFc *	490	110
	hENG(26-437)-hFc **	130	28
	hENG(26-378)-hFc **	95	19
	hENG (26-359) -hFc *	86	23
	hENG (26-346) -hFc *	140	28

[0533] *CHO细胞衍生的蛋白质

[0534] **HEK293细胞衍生的蛋白质

[0535] 上述结果指示，包含hENG ECD的某些C末端截短变体的融合蛋白显示出与BMP9和BMP10的高亲和力结合，但与各种其他TGF-β家族配体(包括TGFβ1和TGFβ3)并非如此。特别地，与全长构建体hENG(26-586)-hFc和截短变体hENG(26-437)-hFc相比，截短变体hENG(26-359)-hFc、hENG(26-346)-hFc和hENG(26-378)-hFc显示出对于BMP-9的在平衡时更高的结合亲和力和改善的动力学特性。

[0536] 如上所述，发现短至36个氨基酸的N末端截短物(hENG(61-346)-hFc)消除了与ENG多肽的配体结合。为了预测更短的N末端截短物对配体结合的影响，用修饰的Psipred 3版(Jones,1999,J Mol Biol 292:195-202)计算预测人内皮糖蛋白孤儿结构域的二级结构。分析指示，SEQ ID NO:24的氨基酸26-60所定义的ENG多肽区域内的有序二级结构限于以高置信度预测的在SEQ ID NO:24的位置42-45处的四残基β链和以极低置信度预测的在SEQ IDNO:24的位置28-29处的两残基β链。因此，从SEQ ID NO:24的氨基酸27或28处开始的ENG

多肽变体和任选地从SEQ ID NO:24的氨基酸29-42中的任何一个处开始的那些变体可能保留重要的结构元件和配体结合。

[0537] 对于下文描述的小鼠研究,通过将人内皮糖蛋白的细胞外结构域的截短部分(即,氨基酸27-581)与小鼠IgG1的Fc结构域采用位于这两个结构域之间的最小接头(TGGG)融合来构建ENG-Fc融合蛋白。此构建体被指定为hENG(27-581)-mFc,并且显示出如上所述对于hENG(26-581)-hFc所述的类似的结合亲和力。

[0538] 实施例6:BMP10前肽融合蛋白

[0539] 生成了BMP10前肽-Fc融合蛋白,其包含与人免疫球蛋白G1Fc结构域采用任选的接头融合的C末端截短人BMP10前肽结构域(SEQ ID NO:32的氨基酸22-315)。此融合蛋白被指定为BMP10pro(22-315)-hFc。使用小鼠免疫球蛋白G1Fc结构域生成类似的融合蛋白,其被指定为BMP10pro(22-315)-mFc。考虑与BMP10前肽-Fc融合蛋白一起使用的信号序列包括例如天然人BMP10前体前导序列MGSLVLTLCALFCLAAYLVSG(SEQ ID NO:81)、蜜蜂蜂毒肽和组织TPA前导序列。

[0540] 具有TPA前导序列的人BMP10pro(22-315)-hFc多肽序列(SEQ ID NO:82)如下所示:

[0541]

```
1    MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASPIMNL EQSPLEEDMS LFGDVFSEQD
51   GVDFNTLLQS MKDEFLKTLN LSDIPTQDSA KVDPPEYMLE LYNKFATDRT
101  SMPSANIIRS FKNEDLFSQP VSFNGLRKYP LLFNVSIPHH EEVIMAELRL
151  YTLVQRDRMI YDGVDRKITI FEVLESKGDN EGERNMLVLV SGEIYGTNSE
201  WETFDVTDAI RRWQKSGSST HQLEVHIESK HDEAEDASSG RLEIDTSAQN
251  KHNPLLIVFS DDQSSDKERK EELNEMISHE QLPELDNLGL DSFSSGPGEE
301  ALLQMRSNII YDSTARIRTG GGTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
351  LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
401  RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
451  LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
501  DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ
ID NO: 82)
```

[0542] BMP前肽结构域是加下划线的。SEQ ID NO:82的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0543] 此BMP10pro(22-315)-hFc融合蛋白由以下核酸序列(SEQ ID NO:83)编码:

[0544]

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCAGCCCCAT CATGAACCTA GAGCAGTCTC
 101 CTCTGGAAGA AGATATGTCC CTCTTTGGTG ATGTTTTCTC AGAGCAAGAC
 151 GGTGTCGACT TTAACACACT GCTCCAGAGC ATGAAGGATG AGTTTCTTAA
 201 GACACTAAAC CTCTCTGACA TCCCCACGCA GGATTCAGCC AAGGTGGACC
 251 CACCAGAGTA CATGTTGGAA CTCTACAACA AATTTGCAAC AGATCGGACC
 301 TCCATGCCCT CTGCCAACAT CATTAGGAGT TTCAAGAATG AAGATCTGTT
 351 TTCCCAGCCG GTCAGTTTTA ATGGGCTCCG AAAATACCCC CTCCTCTTCA
 401 ATGTGTCCAT TCCTCACCAT GAAGAGGTCA TCATGGCTGA ACTTAGGCTA
 451 TACACACTGG TGCAAAGGGA TCGTATGATA TACGATGGAG TAGACCGGAA
 501 AATTACCATT TTTGAAGTGC TGGAGAGCAA AGGGGATAAT GAGGGAGAAA
 551 GAAACATGCT GGTCTTGGTG TCTGGGGAGA TATATGGAAC CAACAGTGAG
```

601 TGGGAGACTT TTGATGTCAC AGATGCCATC AGACGTTGGC AAAAGTCAGG

651 CTCATCCACC CACCAGCTGG AGGTCCACAT TGAGAGCAAA CACGATGAAG

701 CTGAGGATGC CAGCAGTGGA CGGCTAGAAA TAGATACCAG TGCCCAGAAT

751 AAGCATAACC CTTTGCTCAT CGTGTTTTCT GATGACCAAA GCAGTGACAA

801 GGAGAGGAAG GAGGAACTGA ATGAAATGAT TTCCCATGAG CAACTTCCAG

851 AGCTGGACAA CTTGGGCCTG GATAGCTTTT CCAGTGGACC TGGGGAAGAG

901 GCTTTGTTGC AGATGAGATC AAACATCATC TATGACTCCA CTGCCCGAAT

951 CAGAACCGGT GGTGGAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC

1001 TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC

1051 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG

1101 CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG

[0545]

1151 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC

1201 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA

1251 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA

1301 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC

1351 CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG

1401 CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA

1451 ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC

1501 GACGGCTCCT TCTTCCTCTA TAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG

1551 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA

1601 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA (SEQ ID NO: 83)

[0546] 加工的BMP10pro(22-315)-hFc融合蛋白(SEQ ID NO:84)是如下,并且可以任选地提供为从C末端除去赖氨酸。

1 SPIMNL EQSPLEEDMS LFGDVFSEQD

51 GVDFNTLLQS MKDEFLKTLN LSDIPTQDSA KVDPPEYMLE LYNKFATDRT

101 SMPSANIIRS FKNEDLFSQP VSFNGLRKYP LLFNVSIPHH EEVIMAELRL

[0547]

151 YTLVQRDRMI YDGVDRKITI FEVLESKGDN EGERNMLVLV SGEIYGTNSE

201 WETFDVTDAI RRWQKSGSST HQLEVHIESK HDEAEDASSG RLEIDTSAQN

251 KHNPLLIVFS DDQSSDKERK EELNEMISHE QLPELDNLGL DSFSSGPGEE

301 ALLQMRSNII YDSTARIRTG GGTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT

[0548]

```
351   LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
401   RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
451   LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
501   DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ
ID NO: 84)
```

[0549] BMP前肽结构域是加下划线的。

[0550] 生成了另一种BMP10前肽-Fc融合蛋白，其包含与人免疫球蛋白G1Fc结构域采用任选的接头融合的人BMP10前肽结构域的更大的C末端截短物(SEQ ID NO:32的氨基酸22-312)。此融合蛋白被指定为BMP10pro(22-312)-hFc。使用小鼠免疫球蛋白G1Fc结构域生成类似的融合蛋白，其被指定为BMP10pro(22-312)-mFc。考虑与BMP10pro(22-312)-Fc融合蛋白一起使用的信号序列包括例如天然人BMP10前体前导序列、蜜蜂蜂毒肽和TPA前导序列。

[0551] 具有TPA前导序列的人BMP10pro(22-312)-hFc多肽序列(SEQ ID NO:85)如下所示：

[0552]

```
1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASPIMNL EQSPLEEDMS LFGDVFSEQD
51    GVDFNTLLQS MKDEFLKTLN LSDIPTQDSA KVDPPEYMLE LYNKFATDRT
101   SMPSANIIRS FKNEDLFSQP VSFNGLRKYP LLFNVSIPHH EEVIMAELRL
151   YTLVQRDRMI YDGVDRKITI FEVLESKGDN EGERNMLVLV SGEIYGTNSE
201   WETFDVTDAI RRWQKSGSST HQLEVHIESK HDEAEDASSG RLEIDTSAQN
251   KHNPLLIVFS DDQSSDKERK EELNEMISHE QLPELDNLGL DSFSSGPGEE
301   ALLQMRSNII YDSTATGGGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
351   SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
401   SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
451   SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
501   FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID
NO: 85)
```

[0553] BMP前肽结构域是加下划线的。SEQ ID NO:85的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0554] 此BMP10pro(22-312)-hFc融合蛋白由以下核酸序列(SEQ ID NO:86)编码：

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCAGCCCCAT CATGAACCTA GAGCAGTCTC
 101 CTCTGGAAGA AGATATGTCC CTCTTTGGTG ATGTTTTCTC AGAGCAAGAC
 151 GGTGTCGACT TTAACACACT GCTCCAGAGC ATGAAGGATG AGTTTCTTAA
 201 GACACTAAAC CTCTCTGACA TCCCCACGCA GGATTCAGCC AAGGTGGACC
 251 CACCAGAGTA CATGTTGGAA CTCTACAACA AATTTGCAAC AGATCGGACC
 301 TCCATGCCCT CTGCCAACAT CATTAGGAGT TTCAAGAATG AAGATCTGTT
 351 TTCCCAGCCG GTCAGTTTTA ATGGGCTCCG AAAATACCCC CTCCTCTTCA
 401 ATGTGTCCAT TCCTCACCAT GAAGAGGTCA TCATGGCTGA ACTTAGGCTA
 451 TACACACTGG TGCAAAGGGA TCGTATGATA TACGATGGAG TAGACCGGAA
 501 AATTACCATT TTTGAAGTGC TGGAGAGCAA AGGGGATAAT GAGGGAGAAA
 551 GAAACATGCT GGTCTTGGTG TCTGGGGAGA TATATGGAAC CAACAGTGAG
 601 TGGGAGACTT TTGATGTCAC AGATGCCATC AGACGTTGGC AAAAGTCAGG
 651 CTCATCCACC CACCAGCTGG AGGTCCACAT TGAGAGCAAA CACGATGAAG
 701 CTGAGGATGC CAGCAGTGGA CGGCTAGAAA TAGATACCAG TGCCCAGAAT
[0555] 751 AAGCATAACC CTTTGCTCAT CGTGTTTTCT GATGACCAAA GCAGTGACAA
 801 GGAGAGGAAG GAGGAACTGA ATGAAATGAT TTCCCATGAG CAACTTCCAG
 851 AGCTGGACAA CTTGGGCCTG GATAGCTTTT CCAGTGGACC TGGGGAAGAG
 901 GCTTTGTTGC AGATGAGATC AAACATCATC TATGACTCCA CTGCCACCGG
 951 TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
1001 GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
1051 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA
1101 CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG
1151 CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC
1201 AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA
1251 GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
1301 CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
1351 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA
1401 AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC
1451 CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC
1501 TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG
```

[0556]

```
1551 GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA
1601 CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGA (SEQ ID NO: 86)
```

[0557] 加工的BMP10pro(22-312)-hFc融合蛋白(SEQ ID NO:87)是如下,并且可以任选地提供为从C末端除去赖氨酸。

[0558]

```
   1                                SPIMNL EQSPLEEDMS LFGDVFSEQD
  51   GVDFNTLLQS MKDEFLKTLN LSDIPTQDSA KVDPPEYMLE LYNKFATDRT
 101   SMPSANIIRS FKNEDLFSQP VSFNGLRKYP LLFNVSIPHH EEVIMAELRL
 151   YTLVQRDRMI YDGVDRKITI FEVLESKGDN EGERNMLVLV SGEIYGTNSE
 201   WETFDVTDAI RRWQKSGSST HQLEVHIESK HDEAEDASSG RLEIDTSAQN
 251   KHNPLLIVFS DDQSSDKERK EELNEMISHE QLPELDNLGL DSFSSGPGEE
 301   ALLQMRSNII YDSTATGGGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 351   SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
 401   SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 451   SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
 501   FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID
NO: 87)
```

[0559] BMP前肽结构域是加下划线的。

[0560] 上述BMP10pro-Fc融合蛋白可以由COS或CHO细胞系表达并从COS或CHO细胞系纯化,以产生同二聚体BMP10pro-Fc融合蛋白质复合物。

[0561] 各种BMP10pro-Fc融合蛋白质复合物的纯化可以通过一系列柱色谱步骤实现,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。用病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。

[0562] 使用基于Biacore™的结合测定,针对与C末端截短变体BMP10pro(22-315)-hFc和BMP10pro(22-312)-hFc以及相应的小鼠融合蛋白的潜在结合来筛选一组配体。使用抗Fc抗体将BMP10pro-Fc蛋白单独地捕获到系统上,注射配体并使其流经捕获的受体蛋白。BMP10pro(22-315)-hFc和BMP10pro(22-312)-hFc均显示出对BMP10和BMP9的高亲和力。两种构建体还显示出对于BMP6和BMP5的高至中等亲和力。小鼠Fc等同构建体表现相似。BMP10pro(22-312)-hFc也显示出对于BMP3b的高亲和力。未评估BMP10pro(22-315)-hFc对于BMP3b的亲和力。

[0563] 使用在对Smad 1/4/8介导的信号传导有响应的四个连续共有SBE位点(SBE4-luc)的控制下的萤光素酶报告基因构建体,在HMVEC细胞中在BMP10pro(22-315)-hFc和BMP10pro(22-312)-hFc的存在和不存在下分开地测量成熟BMP10介导的活性。结果显示在下表中

[0564]

	IC_{50}（BMP10）	
Fc融合蛋白	（ng/ml）	（pM）
BMP10pro（22-315）-hFc	61.20	516.8
BMP10pro（22-312）-hFc	17.74	149.81

[0565] 数据指示，BMP10前肽可以耐受1、2、3或4个氨基酸的C末端截短而不丧失BMP10拮抗活性。此外，虽然显示两种融合蛋白均为有效的BMP10活性抑制剂，但确定BMP10pro(22-312)-hFc融合蛋白拮抗BMP10活性是BMP10pro(22-315)-hFc的三倍或更多倍。BMP10pro(22-312)-hFc的活性增加是出人意料的，因为它具有比BMP10pro(22-315)-hFc更大的C末端截短。因此，在期望使BMP10抑制最大化的某些用途中，包含在关于SEQ ID NO:32的残基312处结束的BMP10pro结构域的多肽可优于在关于SEQ ID NO:32的残基313-315的任何一个处结束的BMP10pro结构域。另外，为了具有更高的活性，较短的BMP10pro结构域在某些治疗应用中可能是优选的，在所述治疗应用中期望降低针对BMP10pro多肽的免疫应答的风险，即较少的氨基酸降低可能被患者的免疫系统识别的潜在表位的数量。

[0566] 实施例7.BMP10前肽治疗在心力衰竭模型中的作用

[0567] 使用模拟主动脉狭窄的小鼠横向主动脉缩窄(TAC)模型研究BMP10pro(22-312)-Fc对心力衰竭进展的作用。参见例如Nakamura等人(2001)Am JPhysiol Heart Circ Physiol.281:H1104-H1112。

[0568] 在第0天，三十只10周龄C57/B6雄性小鼠接受TAC手术并且十只年龄相仿的动物接受除了TAC以外的相同外科手术(假手术小鼠)。从手术中醒来后，将TAC小鼠随机分成两组。对一组15只小鼠皮下注射10mg/kg剂量的BMP10pro(22-312)-mFc(TAC-BMP10pro小鼠)，并且对第二组15只小鼠皮下注射磷酸盐缓冲盐水(媒介物对照小鼠；TAC-PBS小鼠)，每3天一次，持续21天。在研究结束时，进行超声心动描记术以测量动物被安乐死以供心脏收集之前的左心室功能和重塑。为每颗心脏拍照，将其在10％福尔马林中固定，并且切片用于马松三色染色以评估纤维化。

[0569] 在有意识的小鼠中通过经胸壁超声心动描记术(Acuson P300，18MHz换能器；Siemens)评估体内心脏功能。从左心室短轴视图，获得M模式超声心动图以测量舒张末期的室间隔厚度、舒张末期的左心室后壁厚度、左心室舒张末期直径和左心室收缩末期直径。使用以下等式：FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]从舒张末期直径(EDD)和收缩末期直径(ESD)计算短轴缩短率(FS)。从组织多普勒图像中在二尖瓣水平处的中间或隔膜壁测量早期舒张充盈峰值速度(E)、晚期充盈峰值速度(A)和等容舒张时间(IVRT)。通过测量E/A比率和IVRT评估左心室舒张功能。对于每次小鼠测量，对三至五次心跳取平均值。还计算了21天的总体死亡率。

[0570] 在这项研究中，用BMP10pro(22-312)-Fc治疗小鼠显著地抑制心脏肥大(参见图14)，抑制心脏重塑(参见图15和16)，改善心脏功能(参见图17至图19)，并且组织学数据证实了心肌纤维化的抑制(参见图20)。此外，BMP10pro(22-312)-Fc治疗增加了此心力衰竭模型中动物的存活时间。总之，这些数据证明BMP10前肽治疗可有效治疗心力衰竭，出人意料地可有效治疗心力衰竭的许多不同并发症。这表明与仅治疗心力衰竭的一种或几种并发症的当前护理治疗标准相比，BMP10前肽可能在治疗心力衰竭方面具有优势。此外，由于BMP10

前肽具有选择性BMP结合特征(特别是以高亲和力与BMP10、BMP9、BMP6和BMP3b结合以及在较小程度上与BMP5结合),因此本文呈现的数据表明具有相似结合特性的其他BMP拮抗剂可能在治疗心力衰竭,特别是预防心力衰竭的各种并发症或降低心力衰竭的各种并发症的严重程度的方面具有相似的有益作用。

[0571] 实施例8.Endo-Fc治疗在心力衰竭模型中的作用

[0572] 使用模拟主动脉狭窄的小鼠横向主动脉缩窄(TAC)模型研究hENG(27-581)-mFc对心力衰竭进展的作用。参见例如Nakamura等人(2001)Am JPhysiol Heart Circ Physiol.281:H1104-H1112。

[0573] 在第0天,三十只10周龄C57/B6雄性小鼠接受TAC手术并且十只年龄相仿的动物接受除了TAC以外的相同外科手术(假手术小鼠)。从手术中醒来后,将TAC小鼠随机分成两组。对一组15只小鼠皮下注射10mg/kg剂量的hENG(27-581)-mFc(TAC-Endo),并且对第二组15只小鼠皮下注射磷酸盐缓冲盐水(媒介物对照小鼠;TAC-PBS小鼠),每3天一次,持续21天。在研究结束时,进行超声心动描记术以测量动物被安乐死以供心脏收集之前的左心室功能和重塑。为每颗心脏拍照,将其在10%福尔马林中固定,并且切片用于马松三色染色以评估纤维化。

[0574] 在有意识的小鼠中通过经胸壁超声心动描记术(Acuson P300,18MHz换能器;Siemens)评估体内心脏功能。从左心室短轴视图,获得M模式超声心动图以测量舒张末期的室间隔厚度、舒张末期的左心室后壁厚度、左心室舒张末期直径和左心室收缩末期直径。使用以下等式:FS=100%×[(EDD-ESD)/EDD]从舒张末期直径(EDD)和收缩末期直径(ESD)计算短轴缩短率(FS)。从组织多普勒图像中在二尖瓣水平处的中间或隔膜壁测量早期舒张充盈峰值速度(E)、晚期充盈峰值速度(A)和等容舒张时间(IVRT)。通过测量E/A比率和IVRT评估左心室舒张功能。对于每次小鼠测量,对三至五次心跳取平均值。还计算了21天的总体死亡率。

[0575] 在这项研究中,用hENG(27-581)-mFc治疗小鼠显著地抑制心脏肥大(参见图23),改善心脏功能(参见图24和图25),并且组织学数据证实了心肌纤维化的抑制(参见图26)。此外,hENG(27-581)-mFc治疗增加了此心力衰竭模型中动物的存活时间。总之,这些数据证明内皮糖蛋白多肽治疗可有效治疗心力衰竭,出人意料地可有效治疗心力衰竭的许多不同并发症。这表明与仅治疗心力衰竭的一种或几种并发症的当前护理治疗标准相比,内皮糖蛋白多肽可能在治疗心力衰竭方面具有优势。

[0576] 实施例9.BMP10前肽和Endo-Fc治疗在心肌梗塞模型中的作用

[0577] 使用小鼠心肌梗塞(MI)模型研究BMP10pro(22-312)-Fc和hENG(27-581)-mFc对心力衰竭进展的作用。参见例如Patten R.D.等人(1998)AmJ Physiol.274:H1812-1820。

[0578] 在第0天,三十只10周龄C57/B6雄性小鼠接受LAD手术(MI小鼠)以诱导心肌梗塞,并且十只年龄相仿的动物接受除了LAD以外的相同外科手术(假手术小鼠)。从手术中醒来后,将MI小鼠随机分成三组。对一组15只小鼠皮下注射10mg/kg剂量的BMP10pro(22-312)-Fc(MI-BMP10pro),对第二组15只小鼠皮下注射10mg/kg剂量的hENG(27-581)-mFc(MI-Endo),并且对第三组15只小鼠皮下注射磷酸盐缓冲盐水(媒介物对照小鼠;MI-PBS小鼠),每3天一次,持续28天。在研究结束时,进行超声心动描记术以测量动物被安乐死以供心脏收集之前的左心室功能和重塑。为每颗心脏拍照,将其在10%福尔马林中固定,并且切片用

于马松三色染色以评估纤维化。

[0579] 在有意识的小鼠中通过经胸壁超声心动描记术(Acuson P300,18MHz换能器;Siemens)评估体内心脏功能。从左心室短轴视图,获得M模式超声心动图以测量舒张末期的室间隔厚度、舒张末期的左心室后壁厚度、左心室舒张末期直径和左心室收缩末期直径。使用以下等式:FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]从舒张末期直径(EDD)和收缩末期直径(ESD)计算短轴缩短率(FS)。从组织多普勒图像中在二尖瓣水平处的中间或隔膜壁测量早期舒张充盈峰值速度(E)、晚期充盈峰值速度(A)和等容舒张时间(IVRT)。通过测量E/A比率和IVRT评估左心室舒张功能。对于每次小鼠测量,对三至五次心跳取平均值。还计算了28天的总体死亡率。

[0580] 在这项研究中,用BMP10pro(22-312)-Fc或hENG(27-581)-mFc治疗小鼠显著地抑制心脏肥大(参见图27),抑制心脏重塑(参见图28和图29),并且抑制心肌纤维化(参见图30)。用hENG(27-581)-mFc治疗还改善了心脏功能(参见图31和图32)。此外,hENG(27-581)-mFc或BMP10pro(22-312)-Fc治疗增加了此心力衰竭模型中动物的存活时间。总之,这些数据证明内皮糖蛋白多肽和BMP10pro多肽治疗可有效治疗心肌梗塞后的心力衰竭,出人意料地可有效治疗心力衰竭的许多不同并发症。这表明与仅治疗心力衰竭的一种或几种并发症的当前护理治疗标准相比,内皮糖蛋白多肽和BMP10pro多肽可能在治疗心力衰竭方面具有优势。

[0581] 通过引用并入

[0582] 本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体特此并入,如同每个单独的出版物或专利被明确且单独地指出通过引用并入一样。

[0583] 虽然已经讨论了主题的特定实施方案,但是上述说明书是说明性的而非限制性的。在审阅本说明书和以下权利要求后,许多变化对于本领域技术人员而言将变得清楚。本发明的全部范围应通过参考权利要求及其等同物的全部范围以及说明书和此类变化来确定。

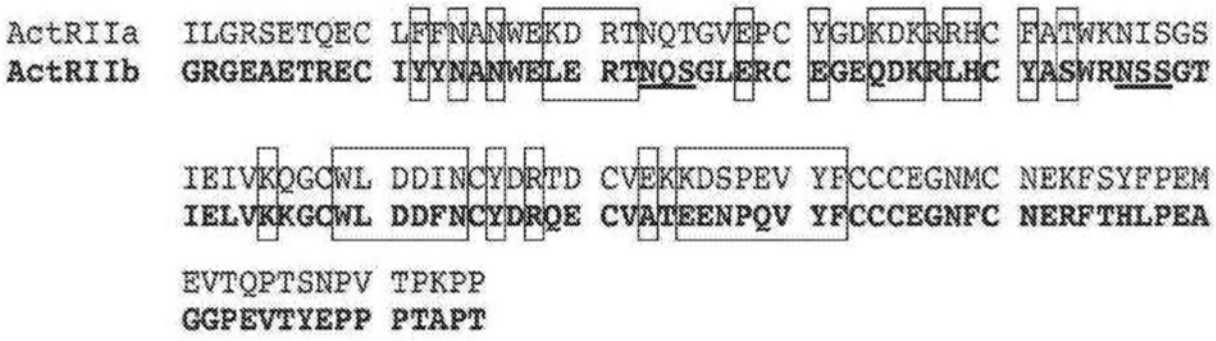
ActRIIa ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
EVTQPTSNPV TPKPP
GGPEVTYEPP PTAPT

图1

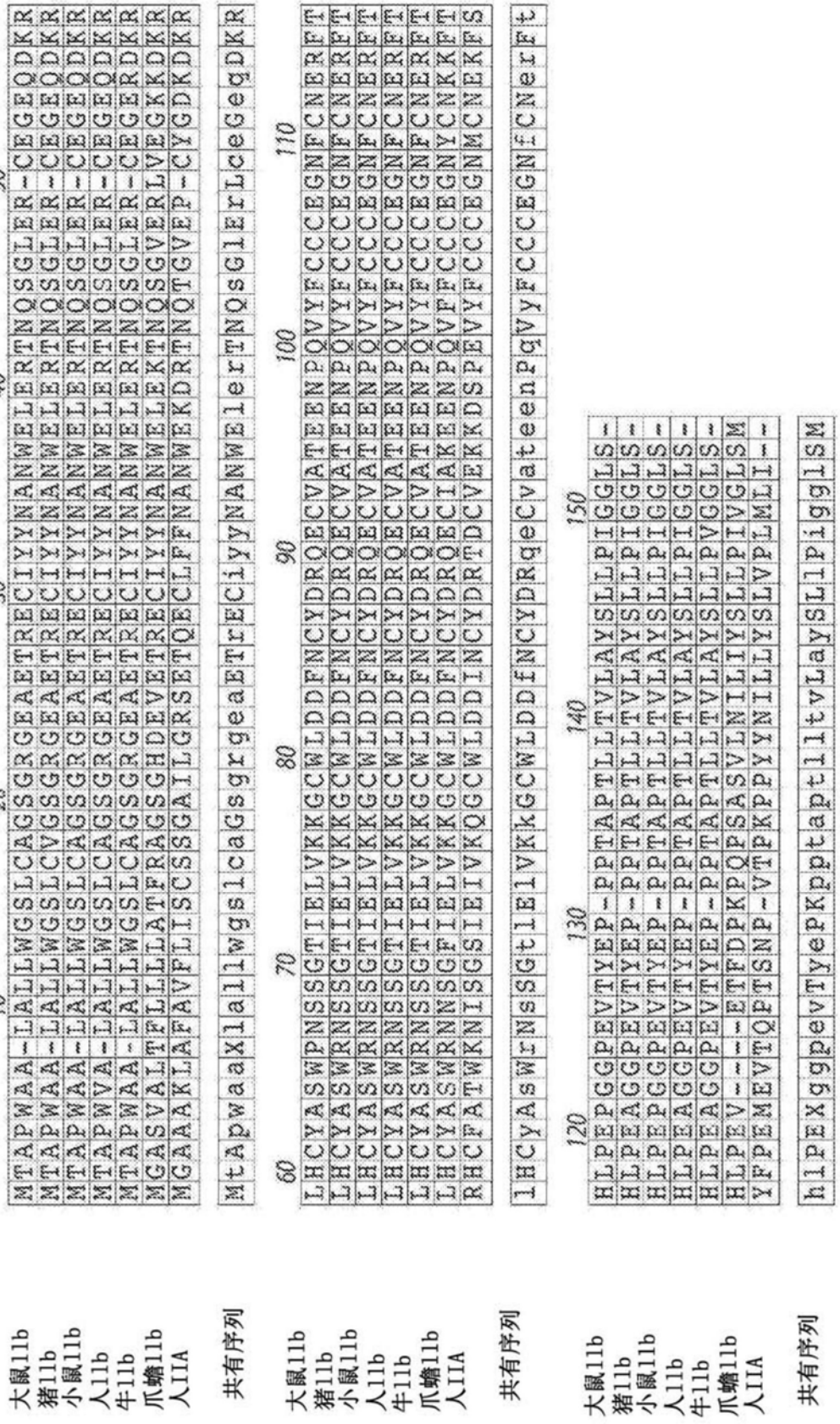

图2

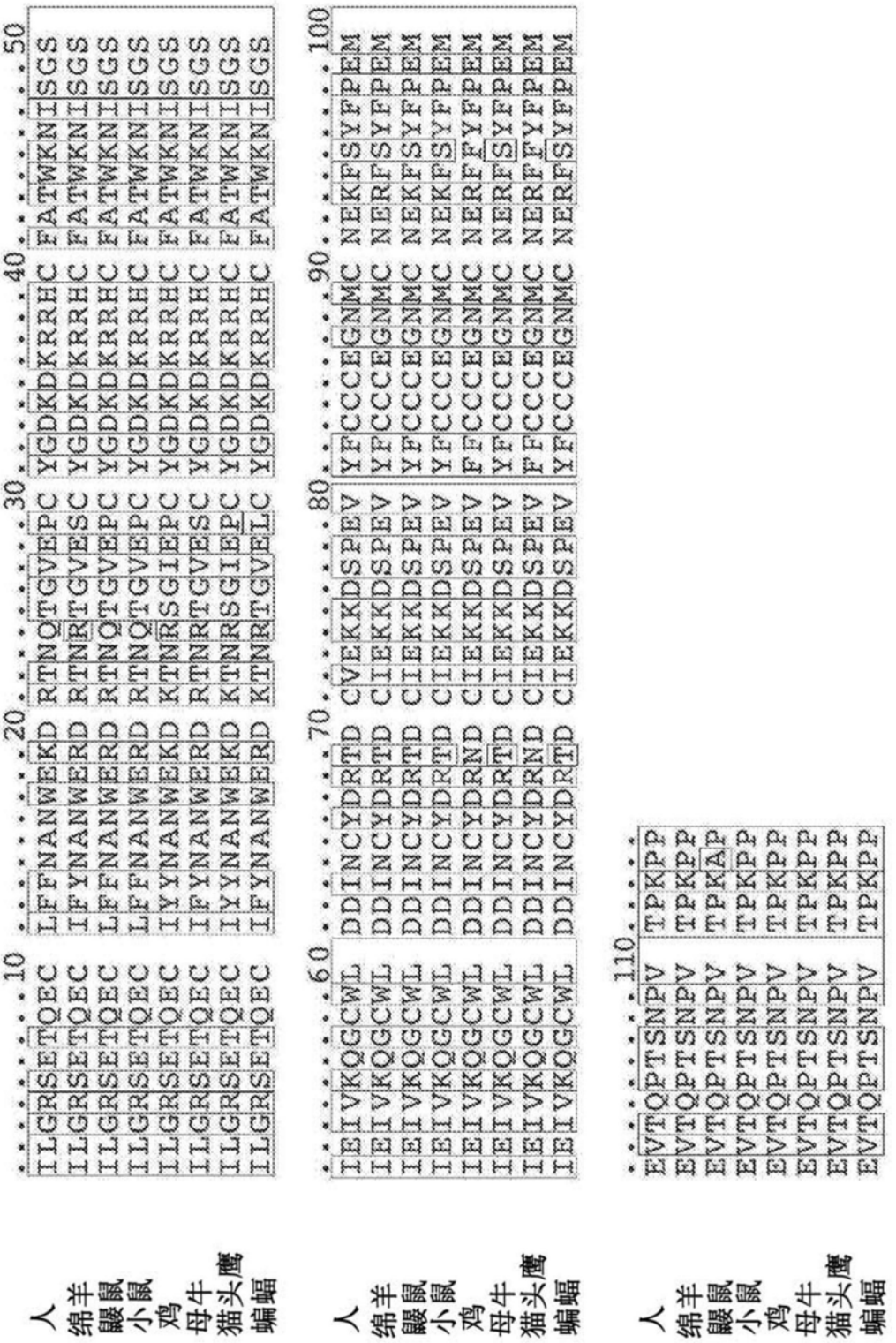

图3

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

IgG1   NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
IgG4   NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
IgG2   NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
IgG3   KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
       :*******************:***:********:*****************.**:.****

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

IgG1   PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
IgG4   PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229
IgG2   PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
IgG3   PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK 232
       *:***********:*********:**:************::******** **
```

图4

```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC 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  ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:123)
```

图5

```
1    ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                              A  E  T   R  E  C   I  Y  Y
51   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
     TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG 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
     TGCGGTTGAC 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 GGCGCAACAG
     CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

        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 CTACTGAAGT

     N  C  Y  D   R  Q  E   C  V  A   T  E  E  N   P  Q  V
251  ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
     TGACGATGCT ATCCGTCCTC 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
     CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401  GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG 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 GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
     TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG
```

图6

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

 851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
       CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901   GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
       CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951   CTTCCTCTAT 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:124)
       GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO:125)
```

图6续

```
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 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  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 TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
     TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

     Y  F  C     C  C  E  G     N  F  C     N  E  R     F  T  H  L
301  TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
     ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

        P  E  A     G  G  P     E  V  T  Y     E  P  P     P  T
351  CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCGGTG
     GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401  GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG 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 GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
     TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG
```

图7

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

 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
     CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
     CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951 CTTCCTCTAT 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: 126)
     GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 127)
```

图7续

```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC

 51  EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD 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  ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

351  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 131)
```

图8

```
  1  ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 51  KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101  TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPRVTCV
151  VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201  WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
251  VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301  DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 132)
```

图9

```
  1  ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 51  KGCWDDDFNC     YDRQECVATE     ENPQVYFCCC     EGNFCNERFT
101  HLPEAGGPEV  TYEPPPT  (SEQ ID NO: 133)
```

图10

```
  1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                                   E  T   R  E  C   I  Y  Y
 51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
     TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG 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
     TGCGGTTGAC 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 GGCGCAACAG
     CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC 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 GACGACCCTG CTACTGAAGT

     N  C  Y  D   R  Q  E   C  V  A   T  E  E  N   P  Q  V
251  ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
     TGACGATGCT ATCCGTCCTC 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
     CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401  GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG 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 CTGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG
```

图11

```
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 GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751   AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG


801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTTCCTCTAT 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: 134)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 135)
```

图11续

```
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 ATTGAACTGG TCAAGAAAGG 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 GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

       Y  F  C   C  C  E  G   N  F  C   N  E  R   F  T  H  L
301   TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
      ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

       P  E  A   G  G  P   E  V  T  Y   E  P  P   P  T
351   CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCGGTG
      GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401   GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG 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
```

图12

```
 701    GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
        CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 751    AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
        TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

 801    CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
        GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851    GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
        CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901    GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
        CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951    CTTCCTCTAT 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: 136)
         GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 137)
```

图12续

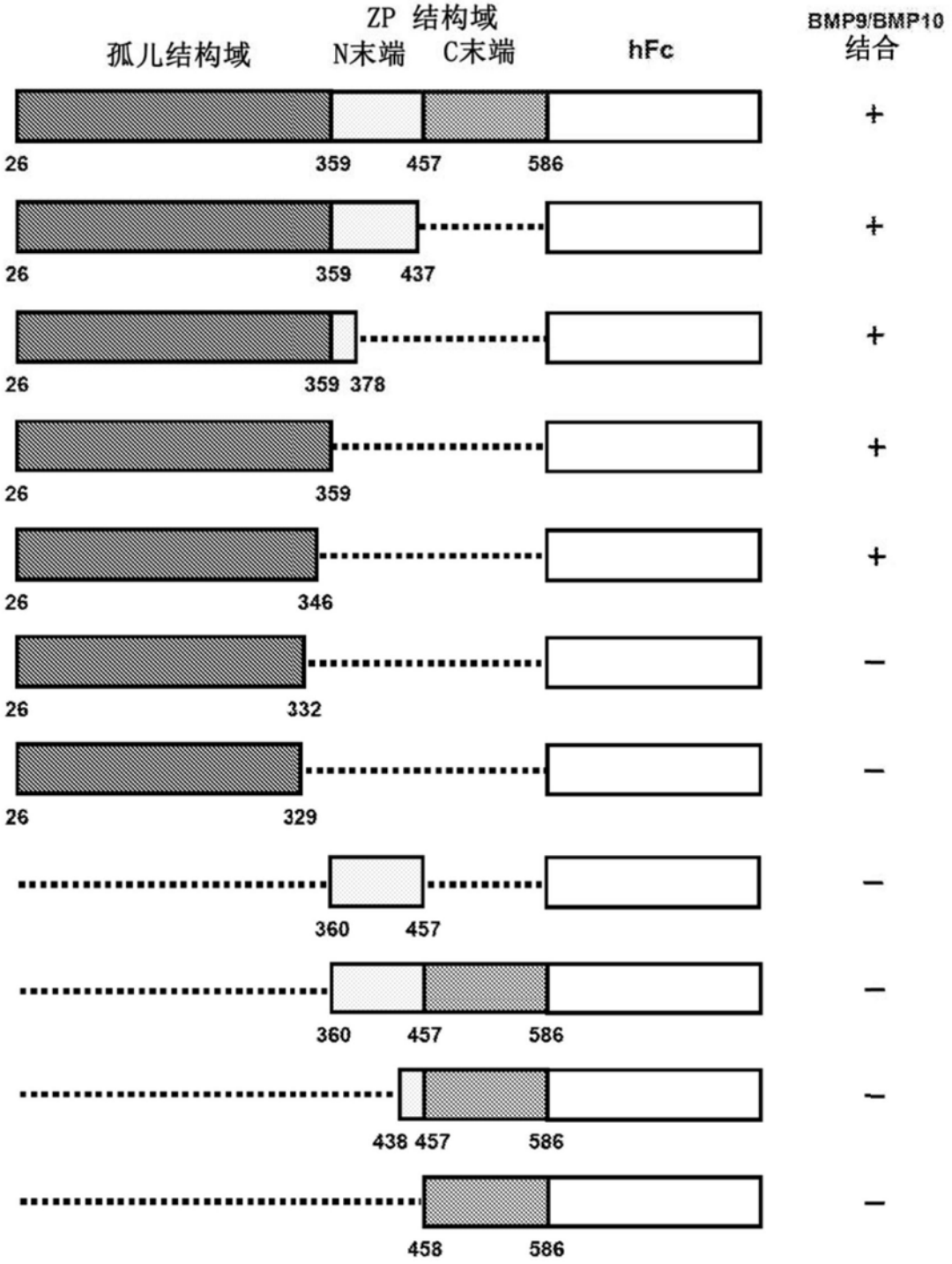
ZP 结构域
孤儿结构域
N末端
C末端
hFc
BMP9/BMP10
结合
26
359
457
586
+
26
359
437
+
26
359
378
+
26
359
+
26
346
+
26
332
−
26
329
−
360
457
−
360
457
586
−
438
457
586
−
458
586
−

图13

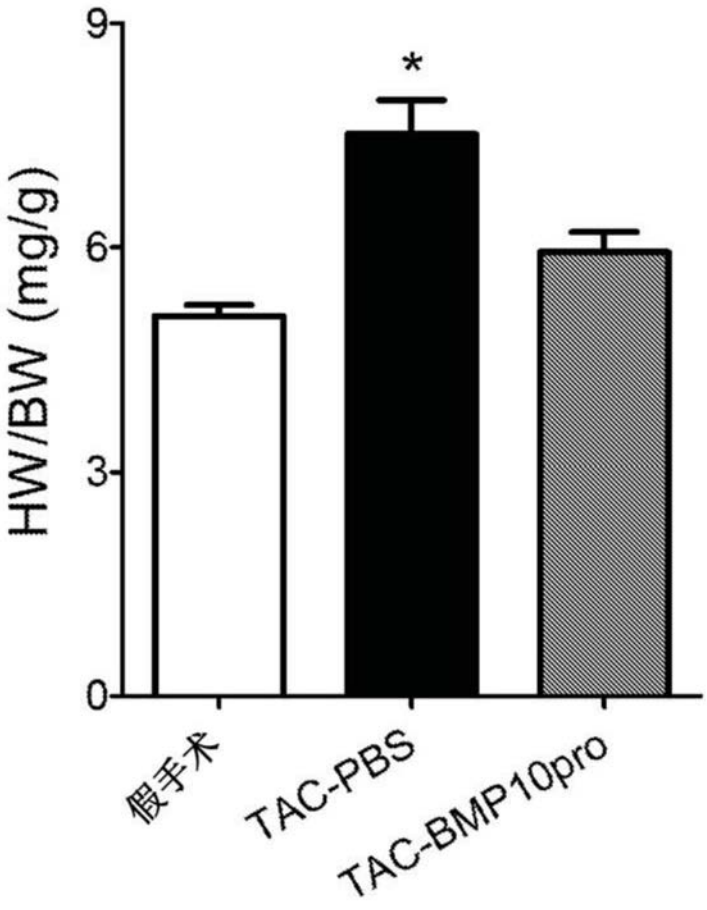

图14

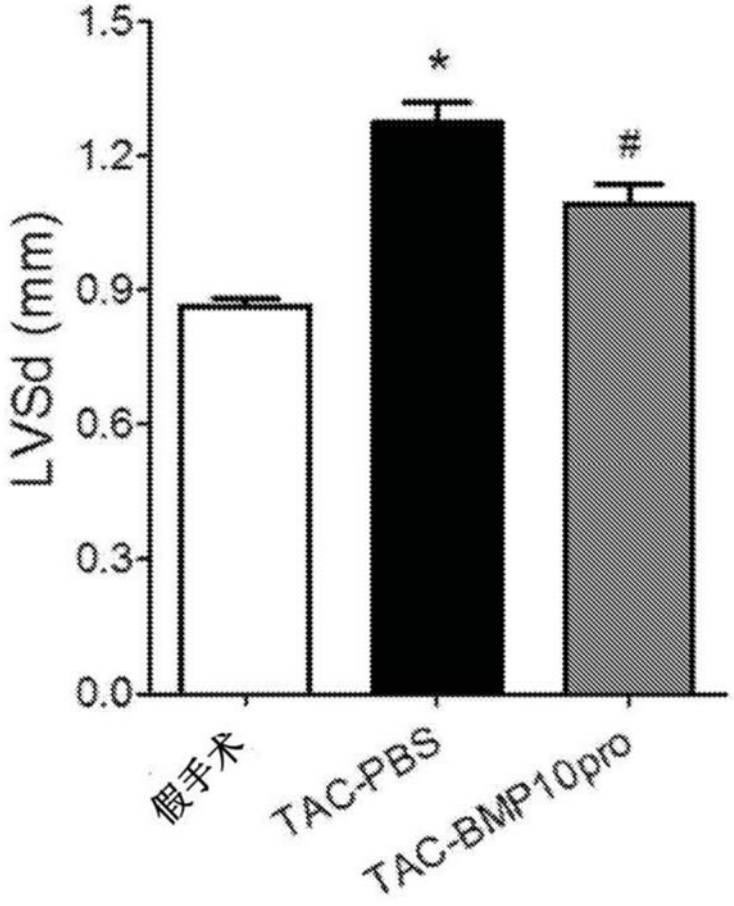

图15

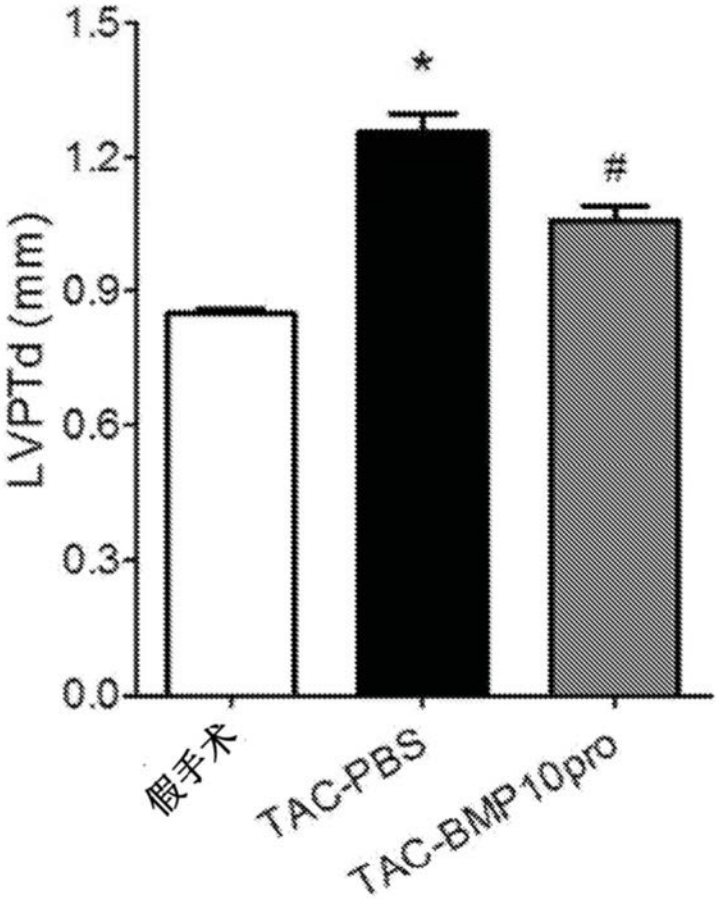

图16

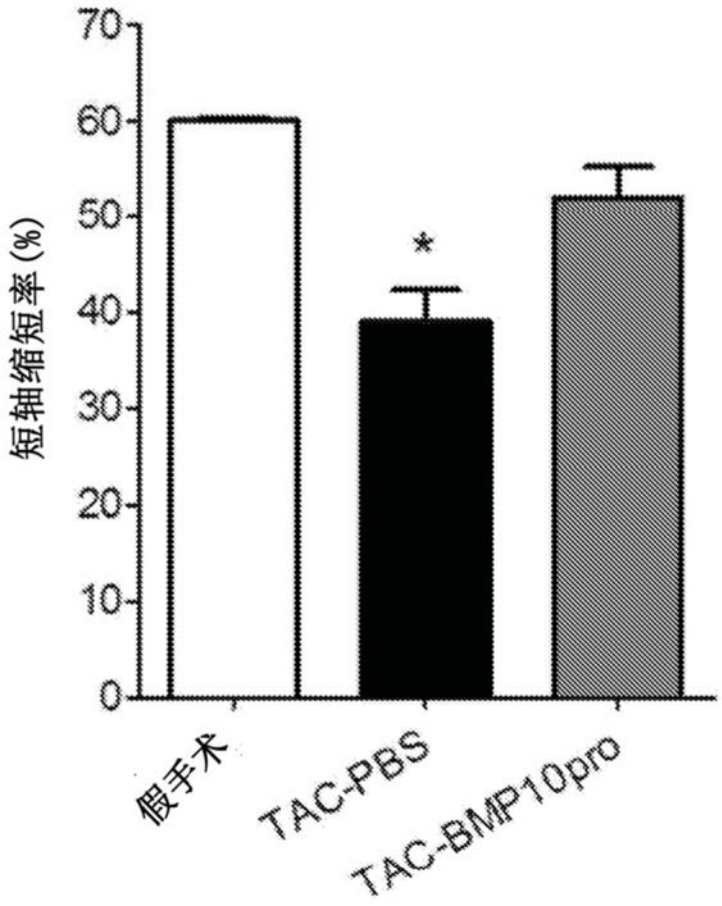

图17

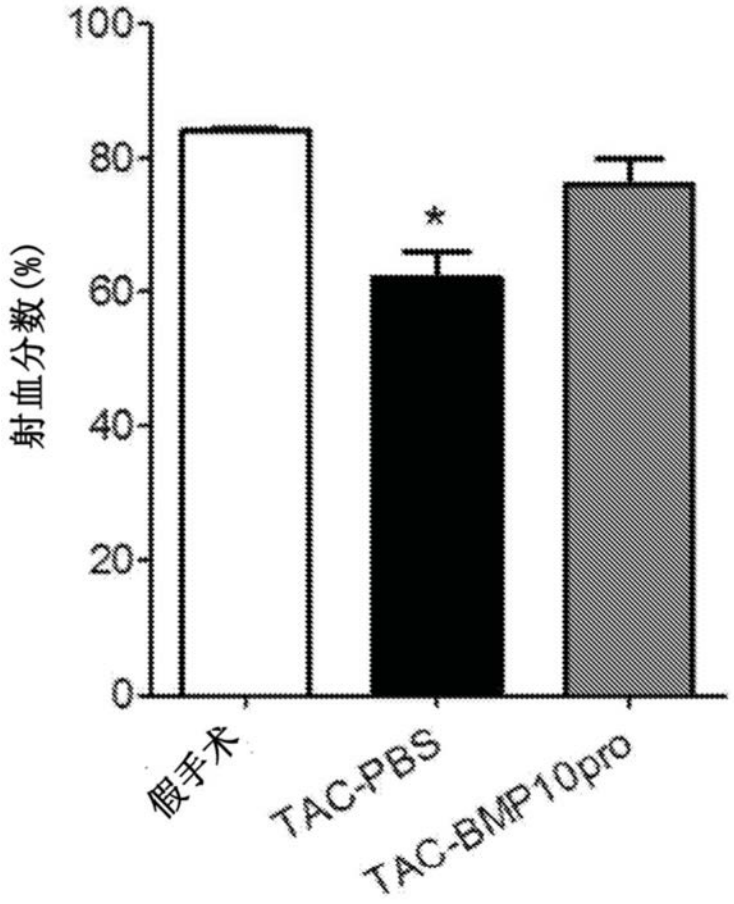

图18

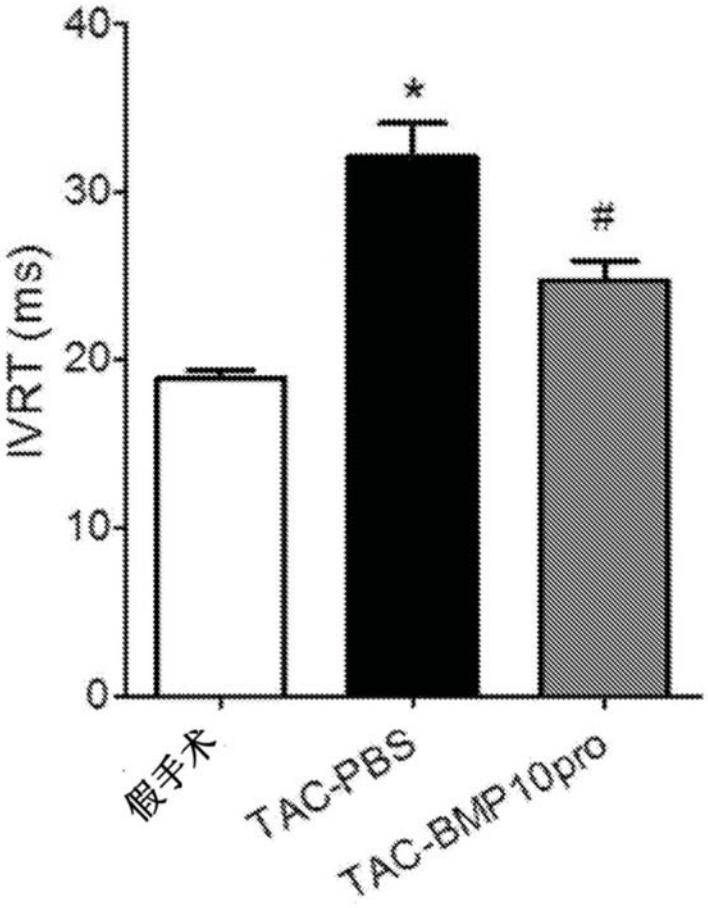

图19

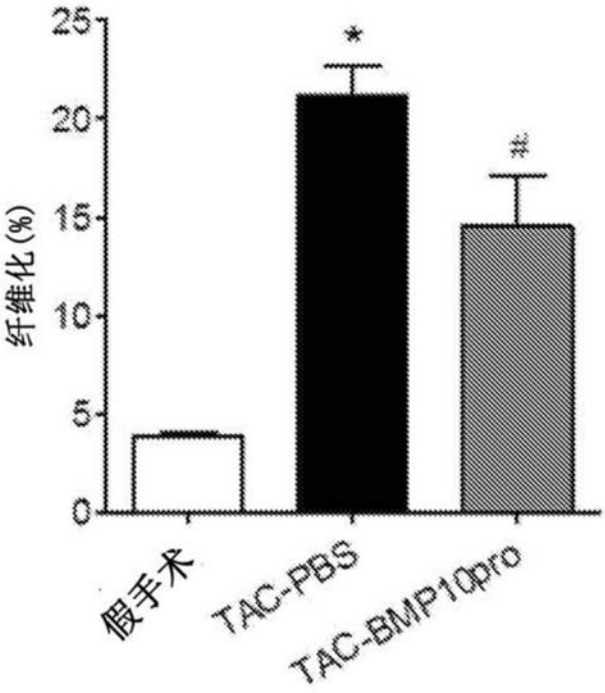

图20

atgggctctctggtcctgacactgtgcgctcttttctgcctggcagcttacttggtttctggcagccccat

catgaacctagagcagtctcctctggaagaagatatgtccctctttggtgatgttttctcagagcaagacg

gtgtcgactttaacacactgctccagagcatgaaggatgagtttcttaagacactaaacctctctgacatc

cccacgcaggattcagccaaggtggacccaccagagtacatgttggaactctacaacaaatttgcaacaga

tcggacctccatgccctctgccaacatcattaggagtttcaagaatgaagatctgttttcccagccggtca

gttttaatgggctccgaaaataccccctcctcttcaatgtgtccattcctcaccatgaagaggtcatcatg

gctgaacttaggctatacacactggtgcaaagggatcgtatgatatacgatggagtagaccggaaaattac

catttttgaagtgctggagagcaaaggggataatgagggagaaagaaacatgctggtcttggtgtctgggg

agatatatggaaccaacagtgagtgggagacttttgatgtcacagatgccatcagacgttggcaaaagtca

ggctcatccacccaccagctggaggtccacattgagagcaaacacgatgaagctgaggatgccagcagtgg

acggctagaaatagataccagtgcccagaataagcataacccttgctcatcgtgttttctgatgaccaaa

gcagtgacaaggagaggaaggaggaactgaatgaaatgatttcccatgagcaacttccagagctggacaac

ttgggcctggatagcttttccagtggacctggggaagaggctttgttgcagatgagatcaaacatcatcta

tgactccactgcccgaatcagaaggaacgccaaaggaaactactgtaagaggaccccgctctacatcgact

tcaaggagattgggtgggactcctggatcatcgctccgcctggatacgaagcctatgaatgccgtggtgtt

tgtaactacccccctggcagagcatctcacacccacaaagcatgcaattatccaggccttggtccacctcaa

gaattcccagaaagcttccaaagcctgctgtgtgcccacaaagctagagcccatctccatcctctatttag

acaaaggcgtcgtcacctacaagtttaaatacgaaggcatggccgtctccgaatgtggctgtaga

图21

agccccatcatgaacctagagcagtctcctctggaagaagatatgtccctctttggtgatgttttctcaga

gcaagacggtgtcgactttaacacactgctccagagcatgaaggatgagtttcttaagacactaaacctct

ctgacatccccacgcaggattcagccaaggtggacccaccagagtacatgttggaactctacaacaaattt

gcaacagatcggacctccatgccctctgccaacatcattaggagtttcaagaatgaagatctgttttccca

gccggtcagttttaatgggctccgaaaataccccctcctcttcaatgtgtccattcctcaccatgaagagg

tcatcatggctgaacttaggctatacacactggtgcaaagggatcgtatgatatacgatggagtagaccgg

aaaattaccatttttgaagtgctggagagcaaaggggataatgagggagaaagaaacatgctggtcttggt

gtctggggagatatatggaaccaacagtgagtgggagacttttgatgtcacagatgccatcagacgttggc

aaaagtcaggctcatccacccaccagctggaggtccacattgagagcaaacacgatgaagctgaggatgcc

agcagtggacggctagaaatagataccagtgcccagaataagcataacccttttgctcatcgtgttttctga

tgaccaaagcagtgacaaggagaggaaggaggaactgaatgaaatgatttcccatgagcaacttccagagc

tggacaacttgggcctggatagcttttccagtggacctggggaagaggctttgttgcagatgagatcaaac

atcatctatgactccactgcccgaatcagaagg

图22

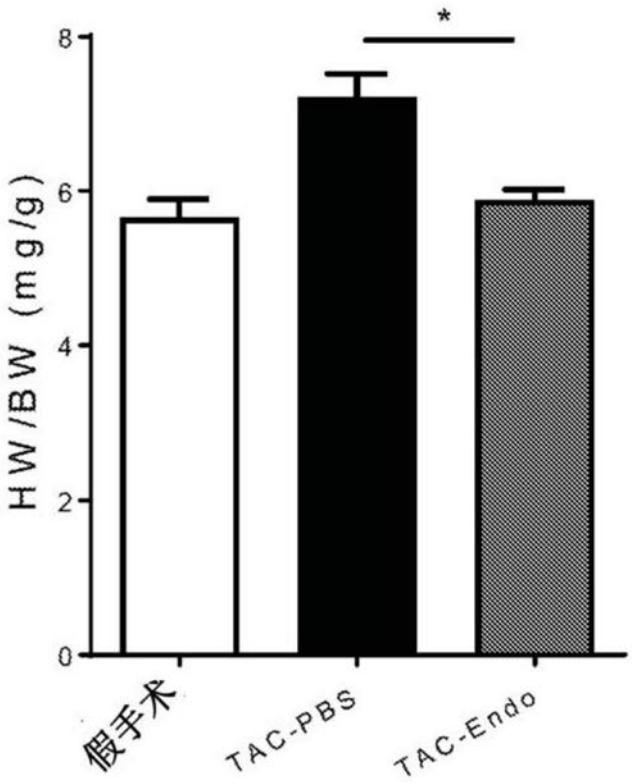

图23

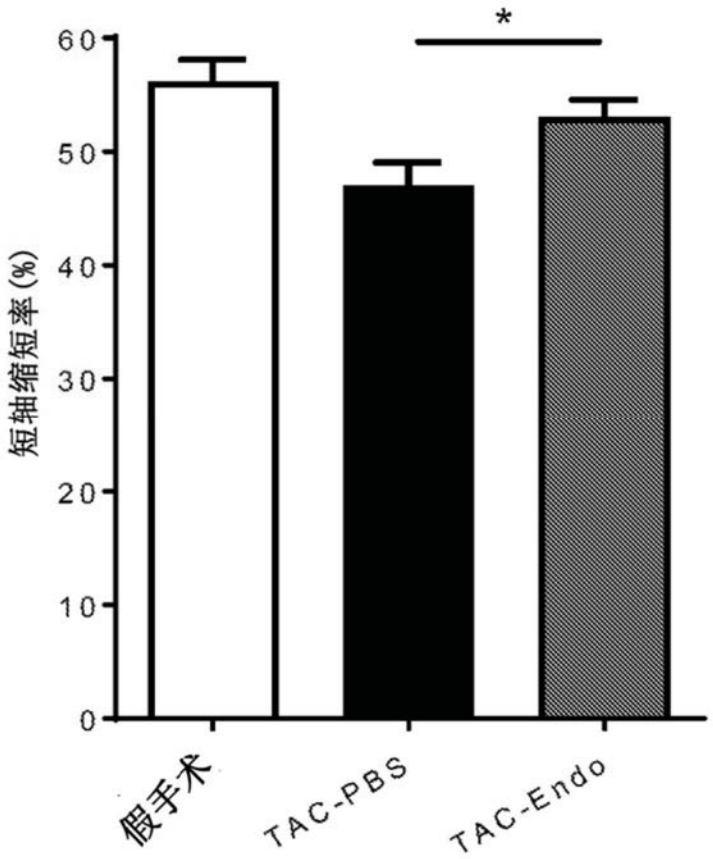

图24

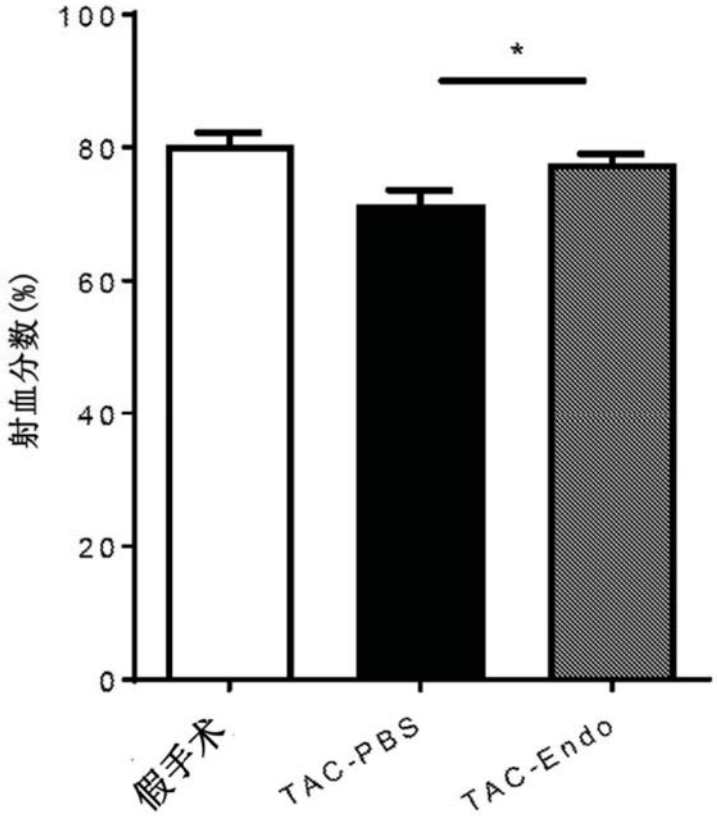
100
80
60
40
20
0
射血分数(%)
*
假手术
TAC-PBS
TAC-Endo

图25

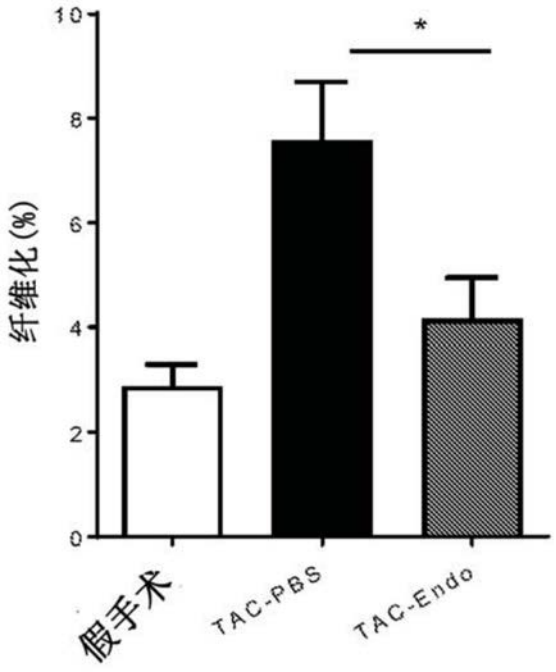
10
8
6
4
2
0
纤维化(%)
*
假手术
TAC-PBS
TAC-Endo

图26

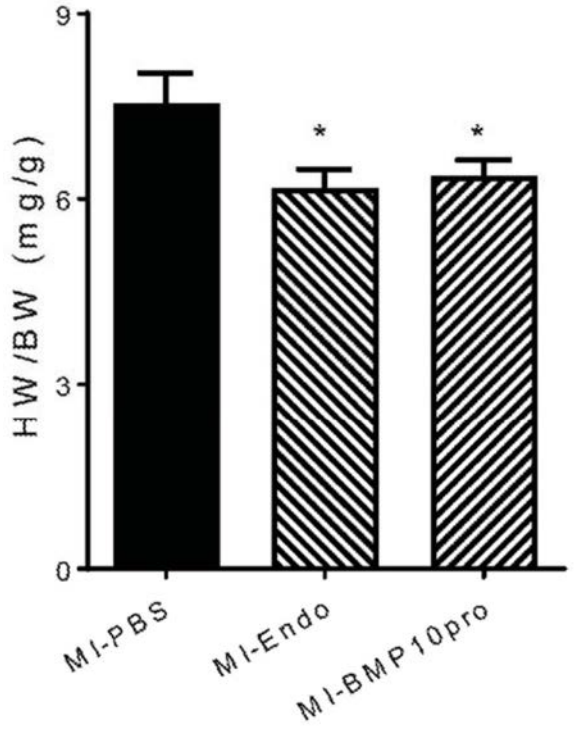
HW/BW (mg/g)
9
6
3
0
*
*
MI-PBS
MI-Endo
MI-BMP10pro

图27

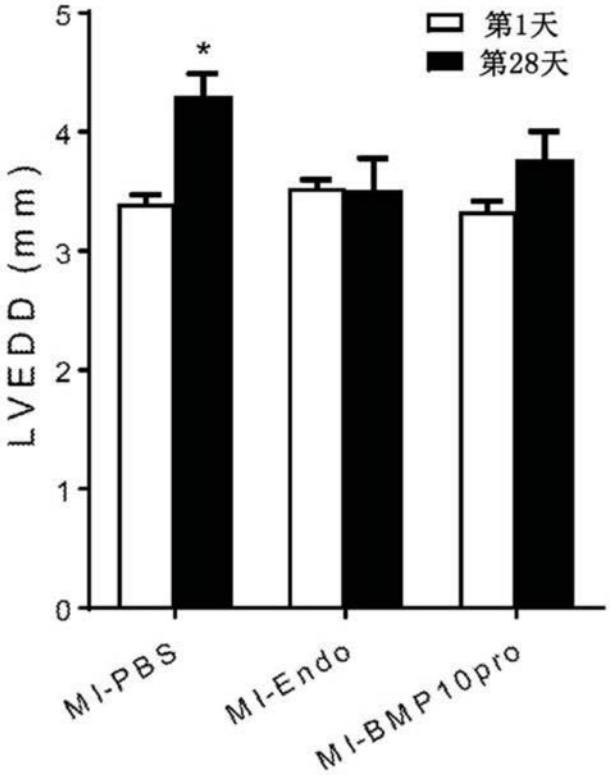
LVEDD (mm)
5
4
3
2
1
0
*
第1天
第28天
MI-PBS
MI-Endo
MI-BMP10pro

图28

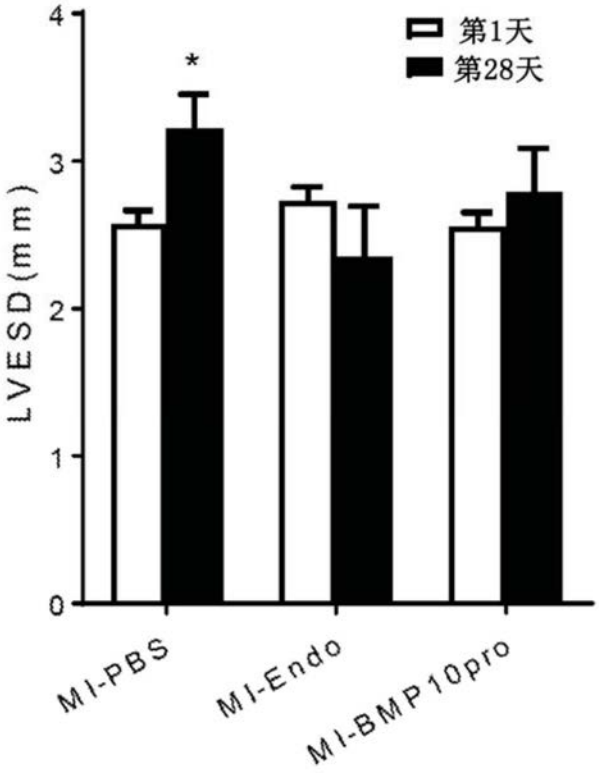
第1天
第28天
LVESD(mm)
0
1
2
3
4
*
MI-PBS
MI-Endo
MI-BMP10pro

图29

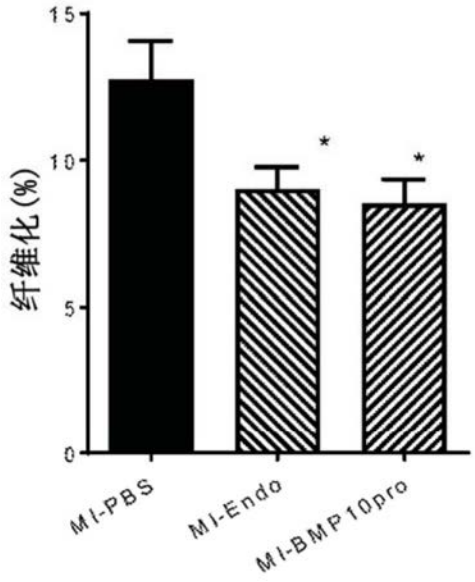
纤维化(%)
0
5
10
15
*
*
MI-PBS
MI-Endo
MI-BMP10pro

图30

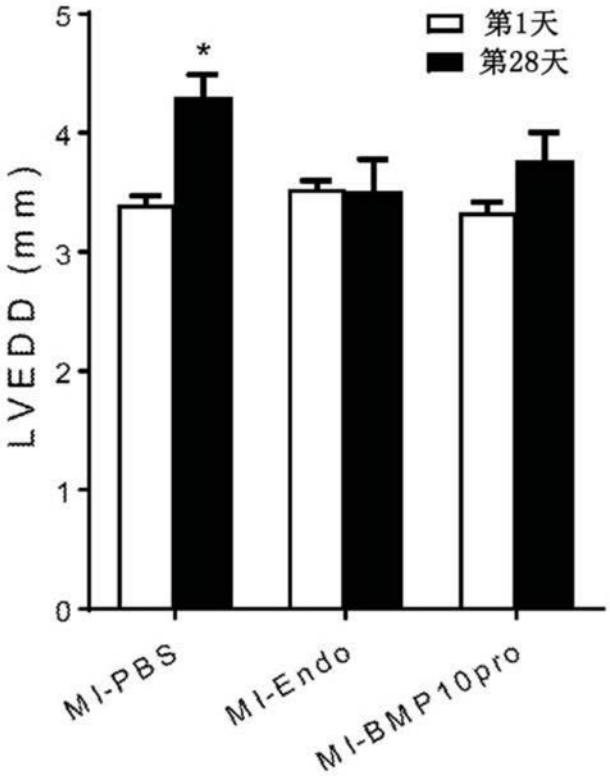
第1天
第28天
*
LVEDD (mm)
0
1
2
3
4
5
MI-PBS
MI-Endo
MI-BMP10pro

图31

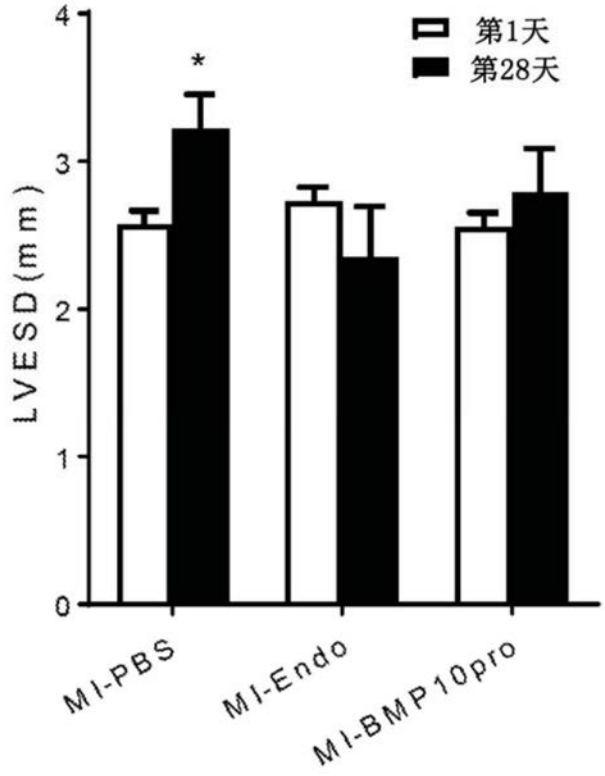
第1天
第28天
*
LVESD(mm)
0
1
2
3
4
MI-PBS
MI-Endo
MI-BMP10pro

图32