(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114470207 B
(45)授权公告日 2023.09.19

(21)申请号 202111239902.7
(22)申请日 2015.08.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114470207 A
(43)申请公布日 2022.05.13
(30)优先权数据
62/031,924 2014.08.01 US
(62)分案原申请数据
201580053901.X 2015.08.03
(73)专利权人 布里格姆及妇女医院股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 莱明·杨 保尔·B·于
(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
专利代理师 董世豪 杨国强
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)
A61P 9/12(2006.01)
(56)对比文件
CN 103443126 A,2013.12.11
CN 103814131 A,2014.05.21
US 2014170158 A1,2014.06.19
WO 2014/111458 A2,2014.07.24
KR 20100013851 A,2010.02.10
CN 101020928 A,2007.08.22
CN 101262877 A,2008.09.10
US 2015/0133521 A1,2015.05.14
EP 2597466 A1,2013.05.29
EP 2372364 A1,2011.10.05
US 2010/0248288 A1,2010.09.30
Nils Nickel等.GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells.《Respir Res》.2011,第12卷(第11期),第162-164页.
孙铃等.生长分化因子15与心血管疾病.《中国动脉硬化杂志》.2010,第18卷(第2期),第1-11页.
Lai-Ming Yung等.Abstract 17285: A Selective Transforming Growth Factor-β and Growth Differentiation Factor-15 Ligand Trap Attenuates Pulmonary Hypertension.《Circulation》.2018,第130卷(第S2期),
(续)
审查员 孙露

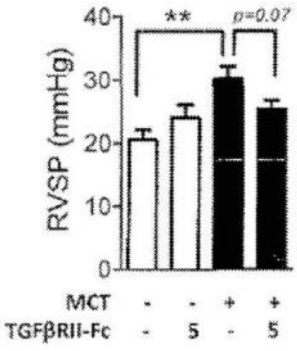
权利要求书1页 说明书31页 附图31页

(54)发明名称

与肺动脉高压的治疗有关的组合物和方法

(57)摘要

本文所述的技术针对的是与TGFβ1、TGFβ3和/或GDF-15的抑制有关的用于治疗高血压(例如肺动脉高压)的组合物和方法。



CN 114470207 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Christina A. Meadows等.Increased Expression of Growth.《Original Research》.2011,第139卷(第5期),

1.TGFBRII-Fc在制备用于对有治疗需要的受试者中的肺动脉高压进行治疗的药物中的用途。

2.如权利要求1所述的用途,其中,所述受试者进一步患有与选自于由以下所组成的组中的疾病或病症相关的纤维化:

肺气肿;COPD;肺纤维化;硬皮病肺病;间质性或肺血管疾病;博来霉素诱导的肺损伤;与早产相关的慢性肺病;以及支气管肺发育不良。

3.如权利要求2所述的用途,其中,所述受试者进一步患有与选自于由以下所组成的组中的疾病或病症相关的纤维化:间质性肺病;以及归因于暴露至化疗药物或其它毒素的肺纤维化。

4.如权利要求2所述的用途,其中,所述受试者进一步患有与选自于由以下所组成的组中的疾病或病症相关的纤维化:特发性肺纤维化;与暴露至抗心律失常药物相关的间质性肺病或肺纤维化;以及与暴露至石棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。

5.如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中,所述受试者是患有或被诊断为患有选自于由以下所组成的组中的疾病或病症的受试者:

肺气肿;COPD;肺纤维化;硬皮病肺病;间质性或肺血管疾病;博来霉素诱导的肺损伤;与早产相关的慢性肺病;以及支气管肺发育不良。

6.如权利要求5所述的用途,其中,所述受试者是患有或被诊断为患有选自于由以下所组成的组中的疾病或病症的受试者:间质性肺病;以及归因于暴露至化疗药物或其它毒素的肺纤维化。

7.如权利要求5所述的用途,其中,所述受试者是患有或被诊断为患有选自于由以下所组成的组中的疾病或病症的受试者:特发性肺纤维化;与暴露至抗心律失常药物相关的间质性肺病或肺纤维化;以及与暴露至石棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。

8.如权利要求1-4中任一项所述的用途,其中,所述受试者患有与肺动脉高压相关的结缔组织病或硬皮病。

与肺动脉高压的治疗有关的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2015年8月3日、发明名称为“与肺动脉高压的治疗 有关的组合物和方法”的申请号为201580053901.X的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 根据35U.S.C.119(e),本申请要求2014年8月1日提交的美国临 时专利申请号62/031,924的权益,以引用的方式将其内容整体并入本文。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明是在由国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的 5K08 HL079943 05号的政府支持下作出的。美国政府对本发明享有一定 的权利。

技术领域

[0006] 本文所述的技术涉及纤维化和/或高血压(例如,肺动脉高压)的治 疗。

背景技术

[0007] 已经尝试了TGF-β信号传导抑制以用于治疗肺动脉高压,但现有策 略(例如,抑制活化素/TGF-βI型激酶受体ALK4/ALK5/ALK7或者所有 的TGFβ配体的非选择性中和)引起例如出血性瓣膜坏死或骨矿化和成 熟的异常的严重副作用,或者例如皮疹和皮肤病变、鼻出血或牙龈出血 的显著副作用。调控这种信号级联的更具体方法可以允许高血压的有效 和安全的治疗。

发明内容

[0008] 如本文所述,本发明人已经发现通过聚焦于配体TGF-β1、TGF-β3 和/或GDF15的抑制来抑制TGFβ信号传导可以对肺动脉高压进行治疗，而不会诱发由广泛抑制活化素/TGFβ配体信号传导受体-配体相互作用而 引起的副作用。

[0009] 在一个方面,本文描述的是在需要治疗的受试者中对高血压或纤维 化进行治疗的方法,所述方法包括向所述受试者给予GDF-15、TGFβ1 和/或TGFβ3的抑制剂。在一些实施方式中,高血压是肺动脉高压(PAH)。在一些实施方式中,受试者是患有或被诊断为患有肺动脉高压(PAH) 的受试者。在一些实施方式中,纤维化是与选自于由以下所组成的组中 的疾病或病症相关的纤维化:肺气肿;COPD;间质性肺病和肺纤维化; 特发性肺纤维化;硬皮病肺病;间质性或肺血管疾病;博来霉素诱导的 肺损伤;归因于暴露至化疗药物(甲氨蝶呤、环磷酰胺)或其它毒素的 肺纤维化;与早产、a.k.a.、支气管肺发育不良相关的慢性肺病;与暴露 至抗心律失常药物(例如胺碘酮)相关的间质性肺病或肺纤维化;以及 与暴露至石棉、二氧化硅或谷物(grain)相关的间质性肺病。在一些实 施方式中,受试者是患有或被诊断为患有选自于由以下所组成的组中的 疾病或病症的受试者:肺气肿;COPD;间质性肺病和肺纤维化;特发性 肺纤维化;硬皮病肺病;间质性或肺血管疾病;博来霉素诱导的肺损伤; 归因于暴露至化疗药物(甲氨蝶呤、环磷酰胺)或其它毒素的肺纤维化; 与早产、a.k.a.、支气管肺发育不良相关的慢性肺病;与暴露至抗心律失 常药物(例如胺碘酮)相关

的间质性肺病或肺纤维化;以及与暴露至石 棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。

[0010] 在一些实施方式中,抑制剂对TGFβ1进行抑制。在一些实施方式中, 抑制剂对TGFβ3进行抑制。在一些实施方式中,抑制剂对TGFβ1和 TGFβ3进行抑制。在一些实施方式中,抑制剂对GDF15进行抑制。在一 些实施方式中,抑制剂进一步对TGFβ1和/或TGFβ3进行抑制。在一些 实施方式中,抑制剂对于GDF15而言是特异性的。在一些实施方式中, 抑制剂对于TGFβ1而言是特异性的。在一些实施方式中,抑制剂对于 TGFβ3而言是特异性的。

[0011] 在一些实施方式中,抑制剂是抗体试剂或配体捕获剂。在一些实施 方式中,配体捕获剂是TGFβ-1/3GDF-15配体捕获剂。在一些实施方式 中,配体捕获剂是TGFBRII-Fc。

[0012] 在一些实施方式中,受试者患有与PAH相关的结缔组织病 (APAH-CTD)或硬皮病。在一些实施方式中,相对于对照,受试者被 确定为具有增高水平的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3。在一些实施方式 中,相对于患有PAH但未显示出APAH-CTD或硬皮病的症状的受试者 中的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3的平均水平,受试者被确定为具有增 高水平的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3。

附图说明

[0013] 图1A至图1H表明大鼠中的野百合碱(MCT)诱导的肺高压与增加 的PAI-1转录活性和升高的GDF15 mRNA水平相关。在用MCT(40mg/kg SC)处理Sprague Dawley大鼠后,在不同的时间间隔对右心室收缩压 (RVSP,图1A)和右心室肥厚(RVH,图1B)方面的变化进行测量。通过右心室导管插入术对RVSP进行测量,并通过右心室(RV)游离壁 的重量对左心室和间隔壁(LV+S)的总和的比例确定RVH(每个时间点 n=3)。经MCT处理的大鼠的肺的定量RT-PCR显示通过升高的PAI-1转 录活性(图1C)和TGFb1转录活性(图1D)反映的增高的TGF-β信号 传导。通过降低的Id1(图1E)和BMPR2(图1F)的mRNA水平示出 了受损的BMP信号传导活性。在经MCT处理的大鼠的肺中的TGFb3的 表达仍然不受影响(图1G)。在经MCT处理的大鼠的肺中还发现升高的 GDF15水平。相较于对照大鼠,*p<0.05,并且**p<0.01(图1H)。

[0014] 图2A至图2D表明了在经MCT处理的大鼠中的TGF-β和BMP信 号传导活性方面的变化与疾病严重性之间的相关性。增加的PAI-1水平 (图2A)与基于RVSP的PH程度直接相关。相比之下,观察到转录靶 标Id1(图2B)和Bmpr2(图2C)的表达降低,两者都具有与RVSP负相关的水平。实验性PAH中的表型和TGFb1的表达之间无相关性(图 2D)。

[0015] 图3A至图3E表明TGFBRII-Fc是体外针对TGFβ1和TGFβ3、而非 TGFβ2的选择性配体捕获剂。TGFb1、TGFb2和TGFb3在人肺动脉平滑 肌细胞(PASMC,图3A)中引发信号传导,而在人肺微血管内皮细胞 (PMVEC,图3B)中引起实质上较低程度的信号传导。将经培养的血 管细胞去除血清,并与多种浓度的BMP4、BMP9、TGFβ1、TGFβ2和 TGFβ3孵育30分钟。实施Western印迹(图3C)和qPCR(图3D至图 3E),以确定TGFBRII-Fc对体外信号传导活性的影响。

[0016] 图4A至图4M表明TGFBRII-Fc减弱右心室收缩压(RVSP)、右心 室肥厚和血管重塑。在用或不用不同剂量的TGFBRII-Fc(15mg/kg,每 周两次)的条件下,用MCT处理3周后,通过在用戊巴比妥进行的麻醉 下的导管插入术和气管内插管以盲法对大鼠进行分析,从而确定RVSP (图4A),并将大鼠进行安乐死。基于Fulton's比例(RV/(LV+S),图4B) 的测量,以盲法对RVH的程度进行评估。将值表示为平均值±SEM,n=6-8, **p<0.01和***p<0.001(相较

于对照大鼠)。对tgfb1(图4C)、pai1(图 4D)、il6(图4E)、il1b(图4L)和icam(图4L)的mRNA水平进行测 定。将值表示为平均值±SEM,n＝3-5,*p<0.05和**p<0.01(相较于对照)。 对远端腺泡内血管(直径10μm-50μm)的肌肉化进行定量,并对未肌 肉化血管、部分肌肉化血管和完全(周向)肌肉化血管的百分比进行计 算(图4F)。TGFBRII-Fc处理(15mg/kg,每周两次)显著降低完全肌 肉化血管的百分比,并引起降低内侧壁厚度指数的趋势。将值表示为平 均值±SEM,n＝89-127个血管/处理组(各自来自6-8只大鼠),p值如所 示出的。在PH确立后用TGFBRII-Fc进行的处理同死亡率和PH的部分 复苏有关。在用MCT(40mg/kg SC)处理之后,以延迟的方式在PH确 立后的第17天开始用TGFBRII-FC(15mg/kg每周三次)对大鼠进行处 理。相较于用辅料处理的大鼠(每组n＝18),Kaplan-Meier分析(图4G) 显示出在经TGFBRII-Fc处理的组中的改善的存活率。在第35天的存活 动物中,在用TGFBRII-Fc处理的动物中存在显著降低的RVSP(图4H), 但在RVH方面不存在显著差异(图4I)。值显示为平均值±SEM,每组 n＝8-11,**p<0.01相较于对照。TGFBRII-Fc处理在具有确立的表型的大 鼠中减弱了肺血管重塑(图4J)。TGBRII-Fc降低了完全肌肉化血管(直 径10μm-50μm)的百分比,并降低了内侧壁厚度指数的百分比,将内 侧壁厚度指数计算为:(外径-内径)/外径×100。n＝89-127个血管/处理组 (各自来自6-8只大鼠)(图4J至图4K)。

[0017] 图5A至图5B表明TGFBRII-Fc在PAH的鼠模型中的效力。将小鼠 用VEGFR阻断剂(SUGEN)进行处理,并暴露至低氧3周。TGFBRII-Fc 处理(15mg/kg,每周3次)降低了RVSP(图5A)并防止了右心室肥厚 (图5B)。

[0018] 图6A至图6B表明转基因小鼠可用于确定GDF15的致病作用。对 GDF15敲除小鼠进行保护以免受SUGEN/缺氧引起的PAH。**p<0.01和 ***p<0.001,如所示出的。

[0019] 图7A至图7B表明GDF15在体外的人主动脉平滑肌细胞(HASMC) 中诱导有效的TGFb信号传导,与肺血管平滑肌细胞中的数据一致。将BMP4、TGFb1和TGFb2用作阳性对照。

[0020] 图8A至图8B表明在HASMC中证实了TGFBRII-Fc阻断TGFb1和 TGFb3信号传导的选择性。*p<0.05并且**p<0.01,如所示出的。

[0021] 图9表明外源GDF15不能诱导人肺动脉内皮细胞(HPAEC)中的 TGFb信号传导,与微血管内皮细胞(HPMVEC)中的数据一致。

[0022] 图10A至图10E表明在经MCT处理的大鼠中,低剂量的TGFBRII-Fc (5mg/kg,每周两次)降低了RVSP(图10A)和右心室肥厚(图10B)。 值得注意的是,低剂量的TGFBRII-Fc处理显著阻止了MCT大鼠中的肺 血管重塑(图10C至图10E)。

[0023] 图11描绘了在用MCT和TGFβRII-Fc处理后的未肌肉化、部分肌肉 化或完全肌肉化的血管的百分比的图。

[0024] 图12描绘了在用MCT和TGFβRII-Fc处理后,bmpr2、id1、tgfb2、 tgfb3、il6和gdf15的mRNA表达的图。

[0025] 图13A至图13D表明TGFRII-Fc选择性地抑制了TGFβ1和TGFβ3 诱导的信号传导。将表达CAGA-Luc的HEK293细胞(图13A)和表达 BRE-Luc报告子转基因的C2C12细胞(图13B)用TGFBRII-Fc (2000ng/ml)孵育30分钟,然后暴露至BMP或TGFβ过夜。将人肺动 脉平滑肌细胞(HPASMC,c-d)除去血清过夜,用TGFBRII-Fc(2000ng/ml) 进行预处理,然后用BMP4(10ng/ml)、TGFβ1(1ng/ml)、TGFβ2(1ng/ml) 或TGFβ3(1ng/ml)处理30分钟,并通过免疫印迹对TGFβ转录靶标 (PAI-1,图13D)以及Smads1、2和3(图13C)的磷酸化进行分析。

TGFBRII-Fc经由TGF-β1和TGF-β3而不是TGFβ2抑制信号传导。(* p<0.05、**p<0.01、***p<0.001,如所示出的)。

[0026] 图14表明TGFBRII-Fc防止了TGFβ诱导的SMC可塑性转换 (plasticity switch)。将HPASMC除去血清过夜,然后暴露至具有或不具 有TGFBRII-Fc(2000ng/ml)的TGFβ1(1ng/ml)24小时。对SMC收缩 标志物(contractile markers)的mRNA水平进行检查。数据为平均值± SEM,*p<0.05、**p<0.01、***P<0.001,如所示出的。

[0027] 图15A至图15E表明,在PAH确立后用TGFBRII-Fc进行的处理与 死亡率和PAH的部分复苏相关。在MCT处理之后,以延迟的方式在PH 确立后的第17天开始用TGFBRII-FC(15mg/kg每周三次)对大鼠进行 处理。用TGFBRII-Fc进行的延迟处理降低了经MCT处理的大鼠(n=3-5) 的肺组织中的TGFβ1、PAI-1、IL-6、IL1b和ICAM-1的表达(图15A至 图15E)。

[0028] 图16A至图16B表明TGFBRII-Fc在PAH鼠模型中的效力。将成年 雄性小鼠用SUGEN进行处理,并暴露至低氧3周。TGFBRII-Fc处理阻 止了经SUGEN低氧处理的小鼠(n=6-8)的肺中的PAI-1的上升(图16A) 并倾向于降低TGFβ1(图16B)的mRNA水平。比例尺=50μm。

[0029] 图17A至图17B表明用TGFBRII-Fc进行的长期处理与二尖瓣结构 方面的形态学变化无关,无硬化或退行性重塑的证据。经辅料和 TGFBRII-Fc处理的大鼠中的二尖瓣的组织学,比例尺=500μm(图17A)。来自超声心动图的代表性追踪显示出经辅料和TGFBRII-Fc处理的大鼠 中的正常的二尖瓣反流(图17B)。

[0030] 图18表明接受辅料或TGFBRII-Fc处理的对照和MCT大鼠的体重。向用MCT(40mg/kg SC×1)处理的成年雄性SD大鼠给予TGFBRII-Fc (15mg/kg IP,每周两次)或辅料3周。TGFBRII-Fc处理不会影响大鼠 体重。

[0031] 图19表明用TGFBRII-Fc延迟处理的MCT大鼠的体重。将成年雄 性SD大鼠用MCT(40mg/kg SC×1)进行处理,并在接受TGFBRII-Fc 处理(15mg/kg IP,每周三次)之前观察18天。在第35天对血液动力学 和重塑进行检查。TGFBRII-Fc处理不会影响大鼠体重。

[0032] 图20A至图20B描绘了以下实验,其中将成年雄性C57BL6/J小鼠 随机化并使之接受常氧、低氧或SUGEN+低氧3周。对RVSP(a)和右 心室肥厚(b)进行测量,并与常氧小鼠进行比较(n=5-8,*p<0.05、** p<0.01、***p<0.001,相较于对照)。

具体实施方式

[0033] 如本文所述,本发明人已经发现,经由重组配体捕获剂TGFBRII-Fc 对TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的抑制降低了TGF-β信号传导并改善了 肺动脉高压(PAH)。靶向受体配体的这一途径比起靶向所有活化素和 TGF-β受体(即ALK4、ALK5和ALK7)和/或所有的受体的配体的途径 具有更少的副作用和毒性。

[0034] 在一个方面,本文描述的是在有治疗需要的受试者中对高血压或纤 维化进行治疗的方法,所述方法包括向受试者给予TGFβ1、TGFβ3和/ 或GDF-15的抑制剂。

[0035] 本文所使用的“高血压(hypertension)”也称为“HTN”或“高的血 压”或“动脉高血压”,是指其中的动脉中的血压升高的医学病症。这需 要心脏比正常更加努力工作,以使血液通过血管循环。通过两次测量(收 缩期和舒张期)对血压进行归纳,收缩期和舒张期取决于心肌在搏动(舒 张)之间是收缩的(心缩期)还是放松的(心舒期),并分别等于最大压 力和最小压力。静息时的正常血压在收缩期为100-140mmHg(顶部读数), 而在舒张期为60-

90mmHg(底部读数)。如果持续在140/90mmHg或以 上,则认为存在高血压。高血压是中风、心肌梗死(心脏病发作)、心力 衰竭或慢性心力衰竭(CHF)、动脉瘤(例如主动脉瘤)、外周动脉疾病 的主要危险因素,并且是慢性肾脏疾病的原因。甚至动脉血压的稳健升 高还与缩短的寿命预期相关。尽管在生活方式改变证实不足或不充分的 人中的药物治疗往往是必要的,但膳食和生活方式的改变可以改善血压 控制并降低相关健康并发症的风险。在一些实施方式中,高血压是肺动 脉高压(PAH)。在一些实施方式中,受试者是患有或诊断为患有肺动脉 高压(PAH)的受试者。在一方面,本文描述的是在有治疗需要的受试 者中对肺动脉高压(PAH)进行治疗的方法,所述方法包括向受试者给 予TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的抑制剂。本文所使用的“肺动脉高压” 或“PAH”是指其中的肺动脉收缩异常的一类肺动脉高压(例如,肺血 管系统中的高血压)。

[0036] 本文所使用的“纤维化”是指作为修复或反应过程而不是作为器官 或组织的正常组分的纤维组织的形成。纤维化的特征在于在任何特定组 织中的成纤维细胞积聚和超过正常沉积的胶原沉积。纤维化可以作为炎 症、刺激或愈合的结果而发生。在一些实施方式中,纤维化是与选自于 由以下所组成的组中的疾病或病症相关的纤维化:肺气肿;COPD;间质 性肺病和肺纤维化;特发性肺纤维化;硬皮病肺病;间质性或肺血管疾 病;博来霉素诱导的肺损伤;归因于暴露至化疗药物(甲氨蝶呤、环磷 酰胺)或其它毒素的肺纤维化;与早产、a.k.a.、支气管肺发育不良相关 的慢性肺病;与暴露至抗心律失常药物(例如胺碘酮)相关的间质性肺 病或肺纤维化;以及与暴露至石棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。在一些实施方式中,受试者是患有或被诊断为患有选自于由以下所组成 的组中的疾病或病症的受试者:肺气肿;COPD;间质性肺病和肺纤维化; 特发性肺纤维化;硬皮病肺病;间质性或肺血管疾病;博来霉素诱导的 肺损伤;归因于暴露至化疗药物(甲氨蝶呤、环磷酰胺)或其它毒素的 肺纤维化;与早产、a.k.a.、支气管肺发育不良相关的慢性肺病;与暴露 至抗心律失常药物(例如胺碘酮)相关的间质性肺病或肺纤维化;以及 与暴露至石棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。

[0037] 本文所述的方法和组合物涉及TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的抑制 剂。本文所使用的“GDF-15”是指生长和分化因子15(NCBI Gene ID NO: 9518),生长因子的转化生长因子-β超家族的成员。已知GDF15结合TGFβ 超家族I型受体(包括TGFBRII)。对于许多物种而言,GDF-15的序列 在本领域中是已知的,例如人GDF-15(多肽序列:SEQ ID NO:1,NCBI Ref Seq:NP_004855)。

[0038] 本文所使用的“TGFβ1”是指转化生长因子β1(NCBI Gene ID NO: 7040),生长因子的转化生长因子-β超家族的成员。已知TGFβ1结合TGFβ 超家族I型受体(包括TGFBRII)。对于许多物种而言,TGFβ1的序列在 本领域中是已知的,例如人TGFβ1(多肽序列:SEQ ID NO:2,NCBI Ref Seq:NP_000651)。

[0039] 本文所使用的“TGFβ3”是指转化生长因子β3(NCBI Gene ID NO: 7043),生长因子的转化生长因子-β超家族的成员。已知TGFβ3结合TGFβ 超家族I型受体(包括TGFBRII)。对于许多物种而言,TGFβ3的序列在 本领域中是已知的,例如人TGFβ3(多肽序列:SEQ ID NO:3,NCBI Ref Seq:NP_003032)。

[0040] 本文所使用的“抑制剂”是指可以降低靶向的表达产物(例如编码 靶标或靶多肽的mRNA)的表达和/或活性的试剂,例如降低至少10%以 上(例如10%以上、50%以上、70%

以上、80％以上、90％以上、95％以 上或98％以上)。可以例如通过对TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的表达产 物的水平和/或TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的活性进行测量,对例如 TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的抑制剂的效力(例如降低TGFβ1、TGFβ3 和/或GDF15的水平和/或活性的能力)进行测定。用于对给定的mRNA 和/或多肽的水平进行测量的方法是本领域技术人员已知的,例如,可以 使用定量RT-PCR以及引物来对RNA的水平进行测定,并且可以使用Western印迹以及抗体(例如抗TGFβ1抗体和/或抗TGFβ3抗体,例如单 克隆抗体1D11)对多肽水平进行测定。可以使用本领域已知的和本文其 它地方所描述的方法对TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的活性进行测定, 例如通过对结合至TGFBRII的TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15的水平进行 测量,或对例如PAI1 mRNA的水平(其中,那些mRNA的降低的水平 表明了TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15活性的降低水平)进行检测。在一 些实施方式中,抑制剂可以是抑制性核酸、适体、抗体试剂、抗体或小 分子。

[0041] 在一些实施方式中,抑制剂可以是抗体试剂。在一些实施方式中, 抑制剂可以是配体捕获剂。如本文所述,“配体捕获剂”是指包含结合靶 分子(例如TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15)的蛋白质的至少一部分的工 程化的多肽。结合靶分子的蛋白质的部分可以是例如受体的胞外结构域、受体的可溶性形式、受体的结合结构域等。在一些实施方式中,配体捕获剂可以进一步包含第二结构域,该第二结构域包含Ig恒定结构域,例 如IgG恒定结构域(例如IgG1)和/或人Ig恒定结构域。第二结构域可 以例如改善配体捕获剂的半衰期。在一些实施方式中,配体捕获剂可以 是TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15配体捕获剂。在一些实施方式中,配体 捕获剂可以是GDF-15和TGFβ1和/或TGFβ3配体捕获剂。在一些实施 方式中,配体捕获剂可以是TGFβ-1/3GDF-15配体捕获剂,例如,它可 以结合至所有三种配体。在一些实施方式中,配体捕获剂可以是 TGFBRII-Fc。本文所使用的“TGFBRII-Fc”是指包含TGFBRII的细胞 外结构域和/或TGFBRII的可溶性诱饵受体的配体捕获剂。在一些实施方 式中,TGFBRII-Fc可以被商购(例如Cat No.314-BR、1003-RT、1600-R2 或532-R2,R&D Systems,Minneapolis,MN)。TGFBRII-Fc也可以从Acceleron(Cambridge,MA)获得。在一些实施方式中,TGFBRII-Fc 可包含SEQ ID NO:4的氨基酸23-159、23-184、24-159、24-184、23-176、24-176、73-159、73-184、73-176。

[0042] 在一些实施方式中,抑制剂对GDF-15而言是特异性的。在一些实 施方式中,抑制剂是半选择性的,例如,它对另外的TGFBR1配体但不 是所有TGFβ配体具有抑制作用。在一些实施方式中,除了GDF-15以外, 抑制剂可对TGFβ1(例如NCBI Gene ID:7040)和/或TGFβ3(例如NCBI Gene ID:7043)进行抑制。

[0043] 本文表明使用TGFBRII-Fc(TGF-β1/3、GDF-15配体捕获剂)拮抗 GDF-15在两种动物模型中改善了肺动脉高压(PAH)。对缺乏GDF-15 的敲除小鼠进行相对保护免于肺动脉高压的发生。此前用于抑制TGF-β 信号传导作为PAH的疗法的途径采用如下策略:通过抑制TGFβI型受 体激酶ALK5而抑制所有TGF-β配体,或使用泛TGF-β抗体中和所有 TGF-β配体。尽管在动物模型中有效,但是这些策略受到各种毒性的限 制,包括归因于这些TGF-β配体的多种的组成性功能的成熟和骨矿化异 常以及出血性瓣膜坏死。

[0044] 如本文所述,使用TGFBRII-Fc的TGF-β配体1和3的半选择性抑 制仍然有效,并且良好耐受。TGFβ1、TGFβ3和/或GDF15在本文中被 认定为这种疗法的有效的重要靶标。此外,它们已经示出,GDF-15的基 因切除显著减弱了PAH,并且针对GDF-15的有效中和抗体减弱

了PAH。

[0045] 对GDF-15而言特异性的人源化或源自人的单克隆抗体可周期性地 给予患有各种类型肺动脉高压的患者。已知具有特别高水平的GDF-15 的具有PAH的特定病因(即,与PAH相关的结缔组织疾病(APAH-CTD) 或硬皮病)的某些患者更受益于中和抗体的治疗。

[0046] 在各种实施方式中,本发明提供了当给予患者时对GDF-15进行抑 制的抗体、肽和核酸以及使用它们的方法。此类GDF-15抑制可以出于 对患者中的病症进行治疗的目的在患者中实施。该病症可以是但不限于 肺动脉高压。

[0047] 在一些实施方式中,本文所述的方法涉及用GDF-15的抑制剂对患 有或被诊断为患有高血压(例如PAH)的受试者进行治疗。可以由医生 使用诊断高血压的现有方法对患有高血压的受试者进行认定。表征这些 病症和帮助诊断的高血压的症状和/或并发症是本领域众所周知的,包括 但不限于头痛、眩晕、耳鸣、头晕或昏厥。可能有助于例如高血压的诊断的测试包括但不限于血压测量。高血压家族史还可以帮助确定受试者 是否可能患有高血压或有助于对高血压进行诊断。

[0048] 在一些实施方式中,根据本文所述方法进行治疗的受试者可以是患 有和/或被诊断为患有与PAH相关的结缔组织疾病(APAH-CTD)或硬皮 病的受试者。

[0049] 在一些实施方式中,根据本文所述方法进行治疗的受试者可以是相 较于对照具有和/或被确定为具有增高水平的GDF-15、TGFβ1和/或 TGFβ3的受试者。在一些实施方式中,GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3的 增高的水平可以是循环的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3的增高的水平。 在一些实施方式中,对照可以是健康受试者和/或健康受试者群体中的 GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3的水平。在一些实施方式中,对照可以是 具有PAH但不显示出硬皮病或APAH-CTD的症状的受试者和/或受试者 群体中的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3的水平。

[0050] 本文所述的组合物和方法可以被给予至患有或被诊断为患有高血压 (例如PAH)的受试者。在一些实施方式中,本文所述的方法包括向受 试者给予有效量的本文所述的组合物(例如GDF-15的抑制剂),以减轻 高血压(例如PAH)的症状。本文所使用的“减轻高血压的症状”是改 善与高血压相关的任何病症或症状。相较于等同的未处理对照,这种降 低是如通过任何标准技术测量的减少至少5%、10%、20%、40%、50%、 60%、80%、90%、95%、99%以上。用于将本文所述的组合物给予至受 试者的各种方式是本领域技术人员已知的。此类方法可以包括但不限于 口服、肠胃外、静脉内、肌内、皮下、透皮、气道(气雾剂)、肺、皮肤、局部或注射给予。给予可以是局部的或全身的。

[0051] 本文所使用的术语“有效量”是指减轻疾病或紊乱的至少一种或多 种症状所需的GDF-15的抑制剂的量,并且涉及用于提供期望效果的药 理学组合物的足够量。因此,术语“治疗有效量”是指当给予至典型的 受试者时足以提供具体的抗高血压效果的GDF-15的抑制剂的量。在各 种上下文中,本文所使用的有效量还将包括足以延迟疾病症状的发展、改变疾病症状的进程(例如但不限于减缓疾病症状的进展)或逆转疾病 症状的量。因此,指定确切的“有效量”通常是不可行的。然而,对于 任何给定的情况,通过本领域普通技术人员仅使用常规实验即可确定合 适的“有效量”。

[0052] 可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药学程序(例如,用于确 定LD50(50%群体致死的剂量)和ED50(在50%群体中治疗有效的剂 量))对有效量、毒性和治疗效力进行确定。剂量可以根据所采用的剂型 和所使用的给予途径而变化。毒性和治疗效果之间的

剂量比是治疗指数，并且可以表示为LD50/ED50之比。优选表现出大的治疗指数的组合物和 方法。最初可以从细胞培养试验对治疗有效剂量进行估算。此外，可以 在动物模型中配制剂量以达到循环血浆浓度范围，该范围包括在细胞培 养物中或在合适的动物模型中确定的IC50(即，达到症状半数最大抑制 的GDF-15的抑制剂的浓度)。可以例如通过高效液相色谱法对血浆中的 水平进行测量。可以通过合适的生物测定法(例如血压的测定法等)对任何特定剂量的效果进行监控。剂量可以由医生确定并根据需要进行调 整以适合所观察到的治疗的效果。

[0053] 在一些实施方式中，本文所述的技术涉及包含本文所述的GDF-15 的抑制剂和任选的药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方式 中，药物组合物的活性成分包含本文所述的GDF-15的抑制剂。在一些 实施方式中，药物组合物的活性成分基本上由本文所述的GDF-15的抑 制剂组成。在一些实施方式中，药物组合物的活性成分由本文所述的GDF-15的抑制剂组成。药学上可接受的载体和稀释剂包括盐水、水性缓 冲溶液、溶剂和/或分散介质。此类载体和稀释剂的使用是本领域公知的。 可用作药学上可接受的载体的材料的一些非限制性实例包括：(1)糖， 例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、 微晶纤维素和乙酸纤维素；(4)粉状黄蓍胶；(5)麦芽；(6)明胶；(7) 润滑剂，例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石；(8)赋形剂，例如可可 脂和栓剂蜡；(9)油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、 玉米油和大豆油；(10)二醇，例如丙二醇；(11)多元醇，例如甘油、 山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG)；(12)酯，例如油酸乙酯和月桂酸 乙酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15)藻酸； (16)无热原水；(17)等渗盐水；(18)林格氏溶液；(19)乙醇；(20) pH缓冲溶液；(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐；(22)填充剂，例如多肽 和氨基酸；(23)血清成分，例如血清白蛋白、HDL和LDL；(24)C_2-C_{12}醇，例如乙醇；以及(25)在药物制剂中使用的其它无毒相容性物质。 润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂 和抗氧化剂也可以存在于制剂中。术语例如“赋形剂”、“载体”、“药学 上可接受的载体”等在本文中可互换使用。在一些实施方式中，载体抑 制活性剂(例如，如本文所述的GDF-15的抑制剂)的降解。

[0054] 在一些实施方式中，包含本文所述的GDF-15的抑制剂的药物组合 物可以是肠胃外剂量形式。由于肠胃外剂型的给予通常绕过患者对污染 物的天然防御，所以肠胃外剂型优选是无菌的或能够在给予患者之前进 行灭菌。肠胃外剂型的实例包括但不限于准备用于注射的溶液、准备用 于被溶解或悬浮在药学上可接受的注射用辅料中的干燥产品、准备用于 注射的悬浮液和乳液。此外，可以制备用于给予患者的控释肠胃外剂型 包括但不限于DUROS®型剂型和剂量倾卸(dose-dumping)。

[0055] 可用于提供如本文所公开的GDF-15的抑制剂的肠胃外剂型的合适 辅料是本领域技术人员公知的。实例包括但不限于无菌水；USP注射用 水；盐水溶液；葡萄糖溶液；水性辅料，例如但不限于氯化钠注射液、 林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、以及乳酸林格 氏注射液；水混溶性辅料，例如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇；以 及非水性辅料，例如但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸 乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。改变或修饰本文公开的抑制剂的 药学上可接受的盐的溶解度的化合物也可以被掺入至本公开的肠胃外剂 型中，包括常规肠胃外剂型和控释肠胃外剂型。

[0056] 包含GDF-15的抑制剂的药物组合物也可以被配制为适于口服给予 (例如作为离散剂型),例如但不限于片剂(包括但不限于刻痕片剂或包 衣片剂)、丸剂、囊片(caplets)、胶囊、可咀嚼片剂、粉末包、扁囊剂 (cachets)、锭剂(troches)、薄片(wafers)、气溶胶喷雾剂或液体剂(例 如但不限于糖浆、酏剂(elixirs)、水性液体中的混悬剂或溶液剂)、非水性液体剂、水包油乳液或油包水乳液。这样的组合物含有预定量的所公 开的化合物的药学上可接受的盐,并且可以通过本领域技术人员熟知的 药学方法来制备。一般参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott、Williams和Wilkins,Philadelphia PA (2005)。

[0057] 常规剂型通常提供从制剂快速或立即释放药物。根据药物的药理学 和药代动力学,常规剂型的使用可引起患者血液和其它组织中的药物浓 度的广泛的波动。这些波动可以影响多个参数,例如给药频率、起效时 间、效力持续时间、治疗剂血液水平的维持、毒性、副作用等。有利地, 控释制剂可用于控制药物的起效时间、作用持续时间、治疗窗内的血浆水平和血液峰值水平。特别地,控释或延长释放剂型或制剂可以用于确 保实现药物的最大有效性,同时将可能由于药物剂量不足(即,低于最 低治疗水平)以及超过药物的毒性水平而产生的潜在的不利作用和安全 问题最小化。在一些实施方式中,可以将GDF-15的抑制剂以持续释放 制剂给予。

[0058] 控制释放的药物产品具有改善药物治疗以超过其非控释对应物所实 现的药物治疗的共同目标。理想地,医学治疗中的优化设计的控释制剂 的使用的特征在于使用最少的药物物质在最短的时间内治愈或控制病 症。控释制剂的优点包括:1)延长药物活性;2)降低剂量频率;3)增 加患者依从性;4)使用较少的总的药物;5)降低局部或全身性副作用;6)药物积累的最小化;7)减少血液水平波动;8)改善治疗效力;9) 减少药物活性的增强或丧失;以及10)改善疾病或病症的控制速度。Kim, Cherng-ju,Controlled Release Dosage Form Design,2(Technomic Publishing,Lancaster,Pa.:2000)。

[0059] 大多数控释制剂被设计为最初释放如下量的药物(活性成分),所述 量的药物迅速产生期望的治疗效果,并且逐渐地和连续地释放其它量的 药物以在延长的一段时间内保持治疗或预防效果的这一水平。为了在体 内保持这种恒定的药物水平,药物必须以偿还从体内代谢和排泄的药物 的量的速率从剂型中释放。可以通过各种条件对活性成分的控释进行刺 激,包括但不限于pH、离子强度、渗透压、温度、酶、水和其它生理条 件或化合物。

[0060] 各种已知的控释或延长释放剂型、制剂和装置可以适于与本公开的 盐和组合物一起使用。实例包括但不限于在美国专利号:3,845,770; 3,916,899;3,536,809;3,598,123;4,008,719;5674,533;5,059,595; 5,591,767;5,120,548;5,073,543;5,639,476;5,354,556;5,733,566和 6,365,185B1中所描述的,通过引用将其各自并入本文。这些剂型可以使 用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、可透过膜、渗透系 统(例如OROS®(Alza Corporation,Mountain View,Calif.USA))或它 们的组合对一种或多种活性成分提供缓释或控释,以提供不同比例的期 望的释放曲线。

[0061] 本文所述的方法可以进一步包括向受试者给予第二药剂和/或治疗, 例如作为组合治疗的一部分。第二药剂和/或治疗的非限制性实例可以包 括钙通道阻滞剂(例如维拉帕米、地尔硫卓和二氢吡啶)、血管紧张素转 化酶抑制剂(ACE-1)(例如卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、 培哚普利、喹那普利、雷米普利、群多普利和贝那普利)、ARB(坎地

沙 坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、奥美沙坦、替米沙坦和缬沙坦)、噻嗪利尿剂、β-阻滞剂(例如阿替洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、奈必洛 尔、氧烯洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和噻吗洛尔)以及α-阻滞剂(例如 多沙唑嗪、酚妥拉明、吲哚拉明、苯氧苄胺、哌唑嗪、特拉唑嗪和妥拉 唑啉)。

[0062] 在某些实施方式中,可以一次向患者给予有效剂量的包含本文所述 的GDF-15的抑制剂的组合物。在某些实施方式中,可以重复向患者给 予有效剂量的包含GDF-15的抑制剂的组合物。对于全身性给予,可以 向受试者给予治疗量的包含GDF-15的抑制剂的组合物,例如,如 0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、 15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg以上。

[0063] 在一些实施方式中,在初始治疗方案之后,可以在较不频繁的基础 上给予治疗。例如,在每两周治疗三个月后,治疗可以每月、六个月或 一年以上重复一次。根据本文所述方法的治疗可以降低病症的症状或标 志物的水平,例如,血压降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、 至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、或 至少90%以上。

[0064] 如本文所述的组合物的剂量可以由医生确定并且根据需要调整以适 合所观察到的治疗效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生 通常对受试者进行监测,以确定治疗在何时提供治疗益处,并确定是否 增加或减少剂量、增加或减少给予频率、中止治疗、恢复治疗、或对治 疗方案进行其它改变。根据众多临床因素,例如受试者对活性成分的敏 感性,给药方案可以从每周一次到每日变化。期望的剂量或活性量可以 一次给予或分成亚剂量(subose)(例如2-4个亚剂量)并在一段时间内 给予,例如以一天中的适当间隔或其它适当的时间表。在一些实施方式 中,给予可以是长期的,例如,在数周或数月的期间内每日一次或多次 给药和/或治疗。给药和/或治疗方案的实例是在1周、2周、3周、4周、 1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或者6个月或更长的一段时间内 每天给予、每天两次给予、每天三次给予或每天四次以上给予。可以在 例如5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或25分钟的时段内给予包含 GDF-15的抑制剂的组合物。

[0065] 根据本文所述的方法,给予GDF-15的抑制剂的剂量范围取决于例 如抑制剂的形式、其效力以及本文所述的病症的症状、标记物或指示物 的期望降低的程度,例如血压期望降低的百分比。剂量不应该大到引起 不良副作用。通常,剂量将随着患者的年龄、身体状况和性别而变化, 并且可以由本领域技术人员确定。在任何并发症的情况下,剂量也可以由个体医师进行调整。

[0066] 熟练的临床医生可以确定GDF-15的抑制剂在例如本文所述的病症 的治疗中的效力、或引起本文所述的应答(例如降低血压)的效力。然 而,如果根据本文所述的方法治疗后,以有益的方式改变了本文所述病 症的一种或多种指征或症状,改善或甚至减缓其它临床上接受的症状, 或者引起至少10%的期望的应答,则治疗被认为是本文所使用的术语“有 效治疗”。可以例如通过对根据本文所述的方法治疗的病症的标志物、指 示物、症状和/或发生率或者任何其它适当的可测量参数(例如血压)进 行测量,对效力进行评估。还可以通过经由住院评估的个体治疗失败恶 化或对医学干预的需要(即,停止疾病进展)对效力进行测量。对这些 指示物进行测量的方法是本领域技术人员所已知的,和/或在本文进行了 描述。治疗包括个体或动物中的疾病的任何治疗(一些非限制性实例包 括人或动

物)，并且包括：(1)抑制疾病，例如，预防症状(例如，疼痛 或炎症)的恶化；或(2)缓解疾病的严重性，例如引起症状消退。用于 治疗疾病的有效量是指当给予有需要的受试者时，对于该疾病而言足以 产生如本文所定义的术语的有效治疗的量。可以通过对期望的应答或病 症的物理指标(例如血压)来确定药剂的效力。通过对这些参数中的任 一个或参数的任意组合进行测量来监测给予和/或治疗的效力在本领域 技术人员的能力范围内。可以在本文所述的病症的动物模型(例如治疗 PAH的小鼠模型)中对效力进行评估。当使用实验动物模型时，在观察 到标志物(例如血压)的统计学显著变化时，证明了治疗的效力。

[0067] 本文提供了体外和动物模型试验，使得能够对给定剂量的GDF-15 的抑制剂进行评估。作为非限制性实例，可通过使细胞与抑制剂接触并 测量例如PAI1和/或IL6的表达来对GDF-15的抑制剂的剂量进行评估， 其中，这些水平的降低表明GDF-15得到抑制。

[0068] 还可以在动物模型(例如，小鼠高血压模型)中对给定剂量组合的 效力评估。例如，可以用野百合碱(MCT)对小鼠进行处理以诱导肺动 脉高压，然后用GDF-15的抑制剂进行治疗。可以通过右心室导管插入 术对右心室收缩压(RVSP)进行测量，并且可以通过右心室(RV)游离 壁的重量对左心室和间隔壁(LV+S)的总和的比例确定右心室肥厚 (RVH)。可以用α平滑肌肌动蛋白和血管性血友病因子对肺组织切片进 行染色，以分别识别血管平滑肌血管和内皮。

[0069] 为方便起见，下面提供了在说明书、实施例和所附权利要求中使用 的一些术语和短语的含义。除非另有说明或者从上下文暗示，下列术语 和短语包含以下提供的含义。提供这些定义以帮助对特定实施方式进行 描述，并不旨在限制所要求保护的发明，因为本发明的范围仅由权利要 求限定。除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本 发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如果本领域中术 语的使用与本文中提供的定义之间存在明显差异，则应以说明书中提供 的定义为准。

[0070] 为方便起见，此处收集了本发明的说明书、实施例和所附权利要求 中使用的某些术语。

[0071] 术语“减少/降低(decrease、reduced、reduction)”或“抑制”在本 文中均用于表示以统计学上显著的量降低。在一些实施方式中，“减少、降低”或“抑制”通常是指相较于参考水平(例如，无给定的治疗)减 少至少10％，并且可以包括例如减少至少约10％、至少约20％、至少约 25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、 至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至 少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少 约99％以上。本文所使用的“减少/降低”或“抑制”不包括相较于参考 水平的完全抑制或减少/降低。“完全抑制”是相较于参考水平100％抑制。减少/降低可以优选下降至无给定疾病的个体的正常范围内接受的水平。

[0072] 本文中使用的术语“增加/增高(increased、increase)”、“增强”或 “活化”是指以统计学上显著的量增加。在一些实施方式中，术语“增 加/增高(increased、increase)”、“增强”或“活化”可以指相较于参考 水平增加至少10％，例如增加至少约20％、或至少约30％、或至少约40％、 或至少约50％、或至少约60％、或至少约70％、或至少约80％、或至少约90％、或高达并包括100％的增高或者相较于参考水平在10％-100％之 间的任意增加，或至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少 约5倍、或至少约10倍增加、或相较于参考水平的2倍-10倍以上之间 的任意增加。在标记物或症状的上下文中，“增加”是以这种水

平的统计 学上显著的增加。

[0073] 本文所使用的“受试者”是指人或动物。通常，动物是脊椎动物， 例如灵长类动物、啮齿动物、家畜或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、 食蟹猴、蜘蛛猴和狨猴，例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、土拨 鼠、雪貂、兔和仓鼠。家畜和狩猎动物包括牛、马、猪、鹿、野牛、水 牛、猫科动物(例如家猫)、犬科动物(例如狗、狐狸、狼)、禽类(例 如鸡、鸸鹋、鸵鸟)以及鱼(例如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。在一些实施方式 中，受试者是哺乳动物，例如灵长类动物，例如人。术语“个体”、“患 者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0074] 优选地，受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、 小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛，但不限于这些实例。除人以外的哺乳动 物可以有利地用作代表高血压动物模型的受试者。受试者可以是男性或 女性。

[0075] 受试者可以是先前已被诊断为患有或者被鉴定为患有或具有需要治 疗的病症(例如高血压)或与此类病症相关的一种或多种并发症的受试 者，并且任选地已经经受高血压或与高血压相关的一种或多种并发症的 治疗的受试者。或者，受试者也可以是先前未被诊断为患有高血压或患 有与高血压相关的一种或多种并发症的受试者。例如，受试者可以是表 现出高血压的一种或多种危险因素、或与高血压相关的一种或多种并发 症的受试者，或未表现出危险因素的受试者。

[0076] 对于特定病症的“需要治疗的受试者”可以是患有该病症、被诊断 为患有该病症、或处于发展出该病症的风险的受试者。

[0077] 术语“药剂”一般指通常不存在或者不以给予至细胞、组织或受试 者的水平存在的任何实体。药剂可选自包括但不限于如下的组：多核苷 酸、多肽、小分子以及抗体或其抗原结合片段。多核苷酸可以是RNA或 DNA，并且可以是单链或双链的，并且可以选自包括如下的组：例如， 编码多肽的核酸和核酸类似物。多肽可以是但不限于天然存在的多肽、 突变的多肽、或保留感兴趣的功能的片段。药剂的进一步的实例包括但 不限于核酸适体、肽-核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、小的有机分子或无 机分子；糖；寡糖；多糖；生物大分子；肽模拟物；核酸类似物和衍生 物；由生物材料(如细菌、植物、真菌或哺乳动物细胞或组织)制成的提取物；以及天然存在的或合成的组合物。可以将药剂施用至介质，其 中，药剂与细胞接触并诱导其作用。或者，药剂可以作为将编码所述药 剂的核酸序列引入细胞的结果而处于细胞中，并且其转录引起细胞内的 核酸和/或蛋白质环境刺激物的生成。在一些实施方式中，药剂是任何化 学品、实体或部分，包括但不限于合成的和天然存在的非蛋白质实体。 在某些特定实施方式中，药剂是具有选自例如未取代或取代的烷基、芳 香族或杂环基部分的化学部分的小分子，包括大环内酯类、leptomycins 及其相关的天然产物或类似物。药剂可已知具有期望的活性和/或性质， 或者可以选自不同的化合物的库。本文所使用的术语“小分子”可以是 至“天然产物样”的化合物，然而，术语“小分子”不限于“天然产物 样”化合物。相反，小分子的典型特征在于其含有多个碳-碳键，并且具 有大于约50道尔顿但小于约5000道尔顿(5kD)的分子量。优选地，小 分子具有小于3kD、更优选小于2kD、最优选小于1kD的分子量。在一 些情况下，优选小分子具有等于或小于700道尔顿的分子量。

[0078] 在一些实施方式中，给定多肽的抑制剂可以是对该多肽特异性的抗 体试剂。本文所使用的“抗体”是指IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子 或其抗原特异性抗体片段(包括但不限于Fab、F(ab')$_2$、Fv、二硫键连接 的Fv、scFv、单结构域抗体、闭合构象多特异性抗体、二硫

键连接的scfv、双特异抗体),而无论其源自天然产生抗体的任何物种或是通过重组 DNA 技术产生的;无论是从血清、B细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或是 细菌中分离的。

[0079] 本文所述的“抗原”是通过抗体药剂上的结合位点结合的分子。通 常,抗原被抗体配体结合,并且能够在体内产生抗体应答。抗原可以是 多肽、蛋白质、核酸或其它分子或其部分。术语“抗原决定簇”是指被 抗原结合分子(更具体地,通过所述分子的抗原结合位点)识别的抗原 上的表位。

[0080] 本文所使用的术语“抗体试剂”是指包括至少一个免疫球蛋白可变 结构域或免疫球蛋白可变结构域序列并且特异性地结合给定抗原的多 肽。抗体试剂可包括抗体或含有抗体的抗原结合结构域的多肽。在一些 实施方式中,抗体试剂可包含单克隆抗体或含有单克隆抗体的抗原结合 结构域的多肽。例如,抗体可包含重(H)链可变区(本文缩写为VH) 和轻(L)链可变区(本文缩写为VL)。在另一个实施例中,抗体包含两 个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体试剂”涵盖抗 体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')2、Fd片 段、Fv片段、scFv和结构域抗体(dAb)片段(参见例如Wildt等,Eur J.Immunol.1996;26(3):629-39;通过引用将其整体并入本文))以及 完整抗体。抗体可以具有IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(以及它们的亚型 和组合)的结构特征。抗体可以来自任何来源,包括小鼠、兔、猪、大 鼠和灵长类动物(人和非人灵长类动物)和灵长类动物化的抗体。抗体 还包括midibodies、人源化抗体和嵌合抗体等。

[0081] VH区和VL区可以进一步细分为称为“互补决定区”(“CDR”)的 高变区,其间插入有更保守的区域(称为“框架区”(“FR”))。已经精确 定义了框架区和CDR的范围(参见Kabat,E.A.等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,US Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,以及Chothia,C.等(1987) J.Mol.Biol.196:901-917;通过引用将其整体并入本文)。每个VH和VL 通常由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序 排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0082] 在本文中可互换使用的术语“抗原结合片段”或“抗原结合结构域” 用于指保留了特异性地结合至感兴趣的靶标能力的全长抗体的一个或多 个片段。包含在术语全长抗体的“抗原结合片段”的范围内的结合片段 的实例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价 片段;(ii)F(ab')2片段,包括在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段 的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的 单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v)由VH或VL结构域组成 的dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546;通过引用将其整 体并入本文);以及(vi)保留特异性抗原结合功能的分离的互补决定区 (CDR)。

[0083] 本文所使用的术语“特异性结合”是指两个分子、化合物、细胞和/ 或颗粒之间的化学相互作用,其中,第一实体以比其结合至第三实体(非 靶标)更大的特异性和亲和力结合至第二靶标实体。在一些实施方式中, 特异性结合可以指第一实体对于第二靶标实体的亲和力是其对第三非靶 标实体的亲和力的至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍以上。对给定靶标特异性的试剂是在所使用的试验条件下对 该靶标显示出特异性结合的试剂。

[0084] 此外,如本文所述,可以进一步对重组人源化抗体进行优化,以降 低潜在的免疫原性,同时保持功能活性,用于人类的治疗。在这方面, 功能活性是指能够展示出与本文所

述的重组抗体或其抗体试剂相关的一 种或多种已知功能活性的多肽。这种功能活性包括例如结合GDF-15的 能力。

[0085] 本文所使用的术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用,表 示通过相邻残基的α-氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列氨基酸残 基。术语“蛋白质”和“多肽”是指氨基酸的聚合物,所述氨基酸包括 经修饰的氨基酸(例如磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物,而 不论其大小或功能。“蛋白质”和“多肽”通常用于指相对大的多肽,而 术语“肽”通常用于指小的多肽,但是本领域中这些术语的使用是重叠 的。当提及基因产物及其片段时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中 可互换使用。因此,示例性多肽或蛋白质包括基因产物、天然存在的蛋 白质、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段,以及前述物质的其它等同物、变体、片段和类似物。

[0086] 本文所使用的术语“核酸”或“核酸序列”是指掺入核糖核酸、脱 氧核糖核酸或其类似物的单位的任何分子,优选聚合分子。核酸可以是 单链的或双链的。单链核酸可以是变性双链DNA的一条核酸链。或者, 单链核酸可以是不衍生自任何双链DNA的单链核酸。在一个方面,核酸 可以是DNA。在另一方面,核酸可以是RNA。合适的核酸分子是DNA, 包括基因组DNA或cDNA。其它合适的核酸分子是RNA,包括mRNA。

[0087] 本文所使用的术语“处理/治疗(treat、treatment、treating)”或“改 善”是指治疗性处理,其目的是逆转、缓解、改善、抑制、减缓或停止 与疾病或障碍(例如,高血压)相关的病症的进展或严重性。术语“处 理/治疗”包括减轻或减缓与高血压相关的病症、疾病或障碍的至少一种 副作用或症状。如果一种或多种症状或临床指标物降低,则治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病的进展减慢或停止,则治疗是“有效的”。 也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,而且包括相较于无治 疗的情况下所预期的,停止或至少减慢症状的进展或恶化。有益的或期 望的临床结果包括但不限于减轻一种或多种症状、减小疾病程度、稳定 (即,不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态、 缓解(无论部分或全部)和/或降低死亡率,无论其是可检测的还是不可 检测的。术语疾病的“治疗”还包括缓和疾病的症状或副作用(包括姑 息治疗)。

[0088] 本文所使用的术语“药物组合物”是指与药学上可接受的载体(例 如在制药工业中常用的载体)组合的活性药剂。本文采用的短语“药学 上可接受的”是指下述化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理的医学 判断范围内,适于与人类和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激、过 敏反应或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相匹配。

[0089] 本文所使用的术语“给予”是指通过一定的方法或途径向受试者中 放置本文所公开的化合物,使得至少将药剂部分递送至期望部位。含有 本文所公开的化合物的药物组合物可以通过任何适当的途径给予,从而 在受试者中产生有效的治疗。

[0090] 术语“统计学上显著”或“显著地”是指统计显著性,并且通常是 指2个标准差(2SD)或更大的差异。

[0091] 除了在操作实施例中或另有指示以外,本文所使用的表示成分的量 或反应条件的所有数字均应理解为在所有情况下均由术语“约”加以修 饰。术语“约”在与百分比连接使用时可以表示±1%。

[0092] 本文所使用的术语“包含”或“包括”是指对于方法或组合物而言 必不可少的组成、方法及其各自的成分,对于包含未指定的要素(无论 是必要的要素或是非必要的要素)

而言也是开放性的。

[0093] 术语“由……组成”是指本文所述的组合物、方法及其各自的成分，排除了在实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0094] 本文所使用的术语“基本上由……组成”是指对于给定的实施方式 而言所需的要素。该术语允许存在实质上不会影响实施方式的基本和新 颖的或功能性的特性的要素。

[0095] 除非上下文另有明确指示，单数术语“一/该/所述(a/an/the)”包 括复数的指示对象。类似地，除非上下文另有明确指示，词语“或”意 在包括“和”。尽管与本文描述的相似或相当的方法和材料可用于本公 开的实践或试验中，在下文中对合适的方法和材料进行了描述。缩写“例 如(e.g.)”源自拉丁文的例如(exempli gratia)，并且在本文中用于表示非限制性的实例。因此，缩写“e.g.”与术语“例如(for example)” 同义。

[0096] 除非本文另有定义，与本申请结合使用的科学和技术术语应具有本 公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。应当理解的是，本发明 不限于本文所述的特定方法、方案和试剂等，因此可以是变化的。这里 使用的术语术仅仅是为了对特定实施方式进行描述的目的，并不旨在限 制本发明的范围，本发明的范围仅由权利要求限定。免疫学和分子生物 学中常见术语的定义可以在以下文献中找到:Merck Sharp&Dohme Corp. 出版的The Merck Manual of Diagnosis and Therapy，第19版，2011(ISBN 978-0-911910-19-3)；Robert S.Porter等编，由Blackwell Science Ltd.出版 的The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine，1999-2012(ISBN 9783527600908)；以及Robert A.Meyers编，由VCH Publishers，Inc出版的Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference，1995(ISBN 1-56081-569-8)；由Elsevier 出版的Immunology by Werner Luttmann，2006；Janeway’s Immunobiology，Kenneth Murphy，Allan Mowat，Casey Weaver编，Taylor&Francis Limited，2014(ISBN 0815345305，9780815345305)；Lewin’s Genes XI，由Jones &Bartlett Publishers出版，2014(ISBN-1449659055)；Michael Richard Green和Joseph Sambrook，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第 四版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，USA(2012)(ISBN 1936113414)；Davis等，Basic Methods in Molecular Biology，Elsevier Science Publishing，Inc.，New York，USA(2012)(ISBN 044460149X)；Laboratory Methods in Enzymology:DNA，Jon Lorsch编，Elsevier，2013(ISBN 0124199542)；Current Protocols in Molecular Science (CPMB)，Frederick M.Ausubel编，John Wiley and Sons，2014(ISBN 047150338X，9780471503385)，Current Protocols in Protein Science (CPPS)，John E.Coligan编，John Wiley and Sons，Inc.，2005；以及 Current Protocols in Immunology(CPI)(John E.Coligan，ADA M Kruisbeek，David H Margulies，Ethan M Shevach，Warren Strobe(编)John Wiley and Sons，Inc.，2003(ISBN 0471142735，9780471142737)，通过 引用将其全部内容并于本文。

[0097] 本文在对本发明各个方面的描述中对其它术语进行定义。

[0098] 出于描述和公开的目的，将本申请全文中引用的所有专利和其它出 版物(包括文字出版物、发行的专利、公开的专利申请和同时待审的专 利申请)以引用的方式明确地并入本文，例如，在此类出版物中描述的 可与本文描述的技术关联使用的方法学。这些出版物仅由于它们的公开 早于本申请的申请日而提供。在这一方面，不应当视作承认了本发明

人 没有权利借助于先前的发明或因为任何其它原因而将此类公开内容提 前。所有关于这些文件的日期的声明或关于这些文件的内容的表述是基 于申请人可获得的信息，并不构成关于这些文件的日期或内容的正确性 的任何承认。

[0099] 对本公开的实施方式的描述并非旨在进行穷举或将本公开限制为所 公开的明确的形式。尽管本文中出于说明性目的描述了本公开的具体实 施方式和实施例，然而正如相关领域的技术人员将了解的，可在本公开 的范围内进行各种等同修改。例如，当以给定的顺序给出方法步骤或功 能时，替代的实施方式能够以不同的顺序执行功能、或可以实质上同时 执行功能。本文所提供的本公开的教导可以施用至其它适当的程序或方 法。本文所述的各种实施方式可以组合以提供进一步的实施方式。如果 需要的话，可对本公开的方面进行修改，以采用上述参考文献和应用的 组合、功能和构思，从而提供本公开的进一步的实施方式。此外，由于 生物功能对等性的考虑，可以在种类或数量上对蛋白结构进行不影响生 物或化学作用的一些改变。根据详细的说明书的启示，可以对本公开作 出这些改变和其它改变。所有这些修饰都旨在包含于所附的权利要求的 范围之内。

[0100] 可将任何上述实施方式中的特定要素与其它实施方式中的要素组合 或置换。此外，尽管在这些实施方式的上下文中已经描述了与本公开的 一些实施方式相关的优点，然而其它实施方式也可以表现出此类优点， 并且，并非所有的实施方式都必须表现出这样的优点才能落入本公开的 范围之内。

[0101] 本文所述的技术通过以下实施例进行进一步说明，而不应被解释为 进行了进一步的限定。

[0102] 本文所述的技术的一些实施方式可以根据下列编号段落的任何一段 进行定义：

[0103] 1.一种对有治疗需要的受试者中的高血压或纤维化进行治疗的方 法，所述方法包括向所述受试者给予TGFβ3、TGFβ1和/或GDF-15的抑 制剂。

[0104] 2.如段落1所述的方法，其中，所述高血压是肺动脉高压(PAH)。

[0105] 3.如段落1-2中任一段所述的方法，其中，所述受试者是患有或被 诊断为患有肺动脉高压(PAH)的受试者。

[0106] 4.如段落1所述的方法，其中，所述纤维化是与选自于由以下所组 成的组中的疾病或病症相关的纤维化：

[0107] 肺气肿；COPD；间质性肺病和肺纤维化；特发性肺纤维化；硬皮病 肺病；间质性或肺血管疾病；博来霉素诱导的肺损伤；归因于暴露至化 疗药物(甲氨蝶呤、环磷酰胺)或其它毒素的肺纤维化；与早产、a.k.a.、 支气管肺发育不良相关的慢性肺病；与暴露至抗心律失常药物(例如胺 碘酮)相关的间质性肺病或肺纤维化；以及与暴露至石棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。

[0108] 5.如段落1或3所述的方法，其中，所述受试者是患有或被诊断为 患有选自于由以下所组成的组中的疾病或病症的受试者：

[0109] 肺气肿；COPD；间质性肺病和肺纤维化；特发性肺纤维化；硬皮病 肺病；间质性或肺血管疾病；博来霉素诱导的肺损伤；归因于暴露至化 疗药物(甲氨蝶呤、环磷酰胺)或其它毒素的肺纤维化；与早产、a.k.a.、 支气管肺发育不良相关的慢性肺病；与暴露至抗心律失常药物(例如胺 碘酮)相关的间质性肺病或肺纤维化；以及与暴露至石棉、二氧化硅或谷物相关的间质性肺病。

[0110] 6.如段落1-5中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂抑制TGFβ1。

[0111] 7.如段落1-5中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂抑制TGFβ3。

[0112] 8.如段落1-7中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂抑制TGFβ1 和TGFβ3。

[0113] 9.如段落1-8中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂抑制GDF15。

[0114] 10.如段落9所述的方法,其中,所述抑制剂进一步抑制TGFβ1和/ 或TGFβ3。

[0115] 11.如段落1-5中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂对于GDF15 而言是特异性的。

[0116] 12.如段落1-5中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂对于TGFβ1 而言是特异性的。

[0117] 13.如段落1-5中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂对于TGFβ3 是而言特异性的。

[0118] 14.如段落1-13中任一段所述的方法,其中,所述抑制剂是抗体试 剂或配体捕获剂。

[0119] 15.如段落14所述的方法,其中,所述配体捕获剂是TGFβ-1/3 GDF-15配体捕获剂。

[0120] 16.如段落15所述的方法,其中,所述配体捕获剂是TGFBRII-Fc。

[0121] 17.如段落1-16中任一段所述的方法,其中,所述受试者患有与PAH 相关的结缔组织病(APAH-CTD)或硬皮病。

[0122] 18.如段落1-17中任一段所述的方法,其中,相对于对照,所述受 试者被确定为具有增高水平的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3。

[0123] 19.如段落18所述的方法,其中,相对于患有PAH但未显示出 APAH-CTD或硬皮病的症状的受试者中的GDF-15、TGFβ1和/或TGFβ3 的平均水平,所述受试者被确定为具有增高水平的GDF-15、TGFβ1和/ 或TGFβ3。

[0124] 实施例

[0125] 实施例1

[0126] 通过用野百合碱(MCT)对大鼠进行处理来诱导肺高压。在用MCT (40mg/kg SC)处理Sprague Dawley大鼠后,在不同的时间间隔对右心 室收缩压(RVSP,图1A)和右心室肥厚(RVH,图1B)方面的变化进 行测量。通过右心室导管插入术对RVSP进行测量,并通过右心室(RV) 游离壁的重量对左心室和间隔壁(LV+S)的总和的比例确定RVH(每个 时间点n＝3)。经MCT处理的大鼠的肺的定量RT-PCR显示通过升高的 PAI-1转录活性(图1C)和TGFb1转录活性(图1D)反映的增高的TGF-β 信号传导。通过降低的ld1(图1E)和BMPR2(图1F)的mRNA水平 示出了受损的BMP信号传导活性。在经MCT处理的大鼠的肺中的TGFb3 的表达仍然不受影响(图1G)。在经MCT处理的大鼠的肺中GDF15水 平升高(图1H)。相较于对照大鼠,*$p<0.05$,并且**$p<0.01$。

[0127] 使用RNA-Seq作为无偏差方法以对实验性PAH的新的致病靶标进 行鉴别。GDF15是经MCT处理的大鼠的肺中的TGFb超家族中的升高最 多的配体(表1)。

[0128] 增加的PAI-1水平(图2A)与基于RVSP的PH程度直接相关。相 比之下,观察到Bmpr2(图2C)及转录靶标ld1(图2B)的表达降低, 两者都具有与RVSP负相关的水平。在实验性PAH中的TGFb1的表达和 表型之间无相关性。GDF15蛋白表达共定位(co-localized)至经MCT处理的大鼠的肺中的CD68阳性细胞和肺血管内皮(数据未示出)。

[0129] 外源GDF15在人肺动脉平滑肌细胞(PASMC,图3A)中引发了有 效的TGFb信号传导活性,但未在人肺微血管内皮细胞(PMVEC,图3B) 中引发。使经培养的血管细胞除去血清,并与在多种浓度下的BMP4、BMP9、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3和GDF15配体孵育30分钟。

[0130] 实施Western印迹(图3C)和qPCR(图3D和图3E),以确定 TGFBRII-Fc在体外对调节信号传导活性的影响。发现TGFBRII-Fc是 TGFβ1、TGFβ3和GDF15的体外选择性配体捕获剂。

[0131] TGFBRII-Fc减弱右心室收缩压(RVSP)、右心室肥厚和血管重塑。 在用或不用不同剂量的TGFBRII-Fc(15mg/kg,每周两次)的条件下, 经MCT处理3周后,通过在用戊巴比妥麻醉的条件下的导管插入术和气 管内插管,以盲法对大鼠进行分析,从而确定RVSP(图4A),并将大鼠 进行安乐死。基于Fulton's比例(RV/(LV+S),图4B)的测量,以盲法 对RVH的程度进行评估。将值表示为平均值±SEM,n=6-8,**p<0.01和 ***p<0.001(相较于对照大鼠)。对tgfb1(图4C)、pai1(图4D)和il6 (图4E)的mRNA水平进行测定。将值表示为平均值±SEM,n=3-5,*p<0.05和**p<0.01(相较于对照)。用α平滑肌肌动蛋白和血管性血友 病因子对肺组织部分进行染色,以分别鉴别血管平滑肌血管和内皮(数 据未示出)。对远端腺泡内血管(直径10μm-50μm)的肌肉化进行定量, 并对未肌肉化血管、部分肌肉化血管和完全(周向)肌肉化血管的百分 比进行计算(图4F)。TGFBRII-Fc处理(15mg/kg,每周两次)显著降 低完全肌肉化血管的百分比,并引起降低内侧壁厚度指数的趋势。将值 表示为平均值±SEM,n=89-127个血管/处理组(各自来自6-8只大鼠), p值如所示出的。在PH确立后用TGFBRII-Fc进行的处理同死亡率和PH 的部分复苏有关。在用MCT(40mg/kg SC)处理之后,以延迟的方式在 PH确立后的第17天开始用TGFBRII-FC(15mg/kg每周三次)对大鼠进 行处理。相较于用辅料处理的大鼠(每组n=18),Kaplan-Meier分析(图 4G)显示出在经TGFBRII-Fc处理的组中的改善的存活率。在第35天的 存活动物中,在用TGFBRII-Fc处理的动物中存在显著降低的RVSP(图 4H),但在RVH方面不存在显著差异(图4I)。值显示为平均值±SEM, 每组n=8-11,**p<0.01相较于对照。TGFBRII-Fc处理在具有确立的表型 的大鼠中减弱了肺血管重塑。

[0132] TGFBRII-Fc在PAH鼠模型中的效力。将小鼠用VEGFR阻断剂 (SUGEN)进行处理,并暴露至低氧3周。TGFBRII-Fc处理(15mg/kg, 每周3次)减少了RVSP并预防右心室肥厚(图5A至图5B)。

[0133] 转基因小鼠可用于确定GDF15的致病作用。对GDF15敲除小鼠进 行保护以免受SUGEN/缺氧引起的PAH(图6A至图6B)。**p<0.01和 ***p<0.001,如所示出的。

[0134] GDF15在体外的人主动脉平滑肌细胞(HASMC)中诱导有效的TGFb 信号传导与肺血管平滑肌细胞中的数据一致。将BMP4、TGFb1和TGFb2 用作阳性对照(图7A至图7B)。

[0135] 在HASMC中证实了TGFBRII-Fc在阻断TGFb1、TGFb3和GDF15 诱导的信号传导方面的选择性(图8A至图8B)。*p<0.05并且**p<0.01, 如所示出的。

[0136] 外源GDF15不能诱导人肺动脉内皮细胞(HPAEC)中的TGFb信号 传导(图7),与微血管内皮细胞(HPMVEC)中的数据一致。

[0137] 在经MCT处理的大鼠中,低剂量的TGFBRII-Fc(5mg/kg,每周两 次)显示出了降低RVSP(图10A)和右心室肥厚(图10B)的趋势。值 得注意的是,低剂量的TGFBRII-Fc处理显著阻止了MCT大鼠中的肺血 管重塑。

[0138] 表1:使用RNA-Seq作为无偏差方法以对实验性PAH的新的致病靶 标进行鉴别。

GDF15是经MCT处理的大鼠的肺中的TGFb超家族中的升 高最多的配体。

[0139]

	MCTvs PBS 倍数变化	p-值
Bmpr2	-1.7	0.1563
Bmprla	1	0.9321
Tgfbrl	1	0.7554
Tgfbr2	1.2	0.5096
Tgfbr3	-1.4	0.1705
Acvr2a	1	1
Acvr2b	-1.2	0.5134
Acvrl	1.1	0.8787
Acvrlb	-1.2	0.3659
Acvrlc	-1.1	0.6498
Bmpl	1.1	0.7753
Bmp2	2.3	0.0102
Bmp3	1.1	0.869
Bmp4	-1.2	0.3078
Bmp5	1	0.9838
Bmp6	-1.7	0.1181
Bmp7	-1.8	0.4159
Bmp8b	-1.5	0.6473

[0140]

Bmp8a	1.2	0.7278
Bmp10	-3.8	0.2094
Bmp15	-1.3	0.7292
Tgfb1	1.5	0.0678
Tgfb2	-1	0.6544
Tgfb3	1.3	0.1295
Inha	1.2	0.7111
Inhba	1.9	0.5848
Inhbb	-1.5	0.0472
CxcllO	2.8	0.0959
ILla	-1.2	0.7093
IL1b	-1	0.5274
Tnf	1	0.5065
Ccl2	1.3	0.7985
Spp1	6.9	0.5074
Vegfa	-1.5	0.0406
Vegfb	-1.2	0.2886
Vegfc	1	0.8721
Gdf2	-1.4	0.5169
Gdf3	1.5	0.8954
Gdf5	-2.1	0.9941
Gdf6	-1	1
Gdf7	-2.1	0.9993
Mstn	-4.6	0.3541
Gdf11	1.5	0.627
Gdf15	3.3	0.0002

[0141] 实施例2:选择性TGF-β配体捕获剂改善了肺动脉高压

[0142] 转化生长因子-β(TGF-β)配体充当了发育和组织稳态、通过I型和 II型丝氨酸-苏氨酸激酶受体进行的信号传导的关键调节因子,以调节转 录程序。基于免疫组织学和基因表达研究,过量的TGF-β信号传导以及 相关的转录和重塑活性牵涉入肺动脉高压(PAH)的

发病机制,以及TGF-β I型受体(ALK5)抑制剂减弱实验性PAH的能力。然而,治疗潜力受到与TGF-β配体的广泛抑制相关的心血管毒性和全身毒性的限制。在本研 究中,我们对选择性TGF-β1/3配体捕获剂(TGFBRII-Fc)是否可以影响 实验性PAH和肺血管重塑进行了研究。用TGFBRII-Fc处理减弱了 SMAD2磷酸化、TGF-β转录靶标PAI-1的正常化表达,并且减轻了经野 百合碱处理的大鼠和经SUGEN-低氧处理的小鼠中的PAH和肺血管重 塑。向建立了PAH的经野百合碱处理的大鼠给予TGFBRII-Fc改善了肺 部压力、存活率和重塑。重要的是,未发现与TGFBRII-Fc处理相关的心 脏结构或瓣膜异常。总的来说,我们的数据表明,对于矫正TGFβ介导 的肺血管重塑和PH而言,选择性TGF-β配体捕获剂可能是有效且可耐 受的策略。

[0143] 肺动脉高压(PAH)是高度病态的病症,其特征在于由进行性肺血 管病变引起的升高的肺血管阻力(PVR)和动脉压力,这导致右心室肥 厚(RVH),并且常常导致右心室衰竭和死亡[1,2]。PAH的肺血管损伤包括 由过度增殖性肌成纤维细胞和内皮谱系组成的新生内膜和阻塞性的损 伤、内侧肥厚,以及作为这种疾病的病证的多通道丛状损伤。PAH的特 发性和遗传性形式与编码骨形态发生蛋白(BMP)II型受体(BMPRII) 的BMPR2中的杂合突变相关[3,4],它是血管内皮细胞和平滑肌以及其它组 织的细胞生理学中具有许多重要功能的转化生长因子-β(TGF-β)信号传 导家族的成员[5-8]。TGF-β信号传导家族包括超过30种配体,所述配体包 括BMP、TGF-β、活化素、以及生长和分化因子(GDF),每种配体均作 为多功能细胞因子对血管稳态和疾病作出潜在的重要贡献[9-11]。

[0144] 虽然BMPR2的PAH相关突变导致BMP信号传导功能丧失,但长期 以来观察到,来自人IPAH的肺组织通过TGF-β途径的增强的活性具有 显著性[12]。实际上,肺高压的多种动物模型(包括由低氧诱导的模型、由野百合碱诱导的损伤模型或血吸虫病感染模型)已经显示出升高的 TGF-β配体表达和下游转录活性的类似证据[13-16]。这些模型中的增强的 TGF-β信号传导与伴随有平滑肌肥厚、血管周围纤维化和细胞外基质重 塑的PAH相关,所有这些都可以用TGF-βI型受体激酶ALK5的药理学 抑制剂来改善[13,17],该抑制剂也抑制密切相关的同源活化素以及Nodal 受体ALK4和ALK7。然而,这种策略的治疗潜力的限制是观察到经由 小分子的ALK4/5/7的有效抑制导致的处于出血性瓣膜坏死形式的显著 的心血管毒性,以及青春期动物股胫关节中的骺板肥大和发育不良[18]。 这显示出识别TGF-β配体TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的中和单克隆抗 体1D11也能够在大鼠的野百合碱PAH模型中减弱肺动脉高压[1,19]。然而, 在人类中使用类似的泛TGF-β中和抗体fresolimumab与剂量相关的副作 用(包括皮疹和皮肤病变、鼻出血、牙龈出血和疲劳)有关[20]。目前还 不清楚TGF-β家族的个体配体的任一者是否有可能是这些作用的主要原 因。在本研究中,我们试图确定选择性TGF-β配体阻断在使用重组 TGFBRII-Fc细胞外结构域融合蛋白的肺血管重塑中的作用。该配体捕获 剂结合TGF-β1和TGF-β3,但不结合TGF-β2,其需要与TGFBRIII(β- 聚糖)相互作用。如本文所述,这样的策略可以改善动物模型中的肺血 管重塑和PAH方面,而不会由于抑制TGF-β2而带来毒性负担,已知在 TGF-β配体中,TGF-β2是在心脏瓣膜形态发生、以及调节各种组织中的 内皮和上皮-间质转化方面唯一发挥作用的[21-29]。

[0145] 材料和方法

[0146] 细胞培养。人肺动脉平滑肌细胞(HPASMC)购自Lonza(CC-2581), 并维持在补充有可商购的生长因子(CC-3182)的SmGM-2培养基中。 将CAGA-Luc和BRE-Luc细胞维持在补充

有10％FBS的DMEM中。将 细胞与不含生长补充剂的0.5％FBS孵育，以在实验刺激前达到静止。需 要注意的是，在实验刺激前30分钟，用TGFBRII-Fc(2000ng/ml)对静 止细胞进行处理。

[0147] 实验性PAH模型。成年雄性Sprague-Dawley大鼠(150g-170g)和 雄性C57BL/6J小鼠(20g-25g)购自Charles River Laboratory。所有实验 和手术方案经哈佛大学机构动物护理和使用委员会批准。将动物在24℃ 下于12小时光-暗循环中饲养。随意获取食物和水。为了诱导PAH，使 大鼠接受野百合碱(MCT，40mg/kg，Oakwood)的单次皮下注射。小鼠 连续三次接受每周皮下注射VEGF受体拮抗剂(SU5416，20mg/kg)，同 时通过输注N_2气(FIO_2＝10％，BioSpherics)将小鼠在调节室中暴露至常 压低氧环境下3周。

[0148] 经MCT处理的大鼠中的预防。在给予MCT后24小时，将大鼠随 机分入接受TGFBRII-Fc(5mg/kg或15mg/kg，每周两次)组或辅料组。 对大鼠处理21天。在第14天，通过超声心动图对心室功能和RV重塑 进行检查。在第21天，对大鼠进行侵入性血液动力学和RVH测量。

[0149] 经MCT处理的大鼠中的复苏。为了测试TGFBRII-Fc逆转已确立的 PAH的能力，在MCT暴露后18天开始随机选择大鼠接受TGFBRII-Fc (15mg/kg，每周三次)或辅料。在第35天对血液动力学和RVH进行 检查。

[0150] SUGEN/低氧小鼠中的预防。在PAH诱导后24小时，将小鼠随机化 并接受TGFBRII-Fc(15mg/kg，每周三次)。在第21天，对小鼠进行血 液动力学和RVH测量。

[0151] LV和RV功能的超声心动图评估。在给予MCT后14天，用1.5％ 异氟烷对大鼠进行麻醉，并保持仰卧位。使用VisualSonics小动物高频超 声探头对肺血流加速度、右心室功能和肥厚以及左心室功能进行检测。实施穿过二尖瓣和三尖瓣的多普勒，以确定TGFBRII-Fc治疗是否导致瓣 膜反流或瓣膜的结构异常。

[0152] 侵入性血液动力学测量和右心室肥厚评估。在指定时间点，用戊巴 比妥(50μg/kg i.p.)对大鼠进行麻醉并通过气管内插管。使用啮齿动物 通气机(TV＝8ml/kg，f＝80/min)对大鼠进行机械通气，并如先前所述， 使用流体填充导管经RV顶点进行压力的侵入性血液动力学测量[19]。用 PBS对肺进行灌注，切除一个右叶，并快速冷冻用于RNA和蛋白质提取。肺部进一步用1％多聚甲醛(PFA)灌注至肺动脉中，随后用气管灌注1 分钟。将左叶包埋在石蜡中。为了获得RVH的程度，移出心脏并从左心 室加隔膜(LV+S)中解剖RV游离壁并分别称重。根据RV/(LV+S)的比 确定RVH的程度。将LV和间隔壁的剩余部分包埋在OCT中并切片。进行H&E染色以检查二尖瓣的解剖结构。

[0153] 肺组织中的血管重塑和p-Smad 2的定量。为了确定肺血管重塑的程 度，用平滑肌α-肌动蛋白和血管性血友病因子对肺组织切片进行染色。以盲法的方式对远端腺泡内血管(直径10μm-50μm)的肌肉化进行评分， 分为无肌肉化、部分肌肉化和完全肌肉化，并且以总血管的百分比表示。 对于完全肌肉化的腺泡内膜血管，根据下式计算内侧壁厚度：内侧厚度 -(外径-内径)/外径×100。通过免疫荧光染色检查冷冻切片的肺组织 (10μm)中的Smad2蛋白的磷酸化。

[0154] 表达研究。将冷冻肺样品匀浆，并使用TRIZOL试剂提取总RNA。如所述的实施逆转录酶和定量PCR。通过Ct方法测定各感兴趣的基因的 相对表达水平，并以相对于β-肌动蛋白的表达的比表示。

[0155] 试剂。在CHO细胞中将重组TGFBRII表达为具有IgG Fc结构域的 融合蛋白

(TGFBRII-Fc)，并如前所述进行纯化。针对磷酸化(p-)Smad3 (p-Smad3)、p-Smad1/5、p-Smad2和总Smad3的一抗购自Cell Signaling。针对平滑肌α-肌动蛋白和血管性血友病因子的一抗分别购自Sigma和 Dako。重组TGFβ-1、TGFβ-2、TGFβ-3和BMP4购自R&D。

[0156] 统计分析。相对于处理组，以盲法的方式一致地进行侵入性血液动 力学压力测量的定量分析以及RVH和肺血管重塑的评估，所有动物和组 织样品的身份由未参与数据收集的个体掩蔽。数据表示为平均值±测量 值标准误(SEM)，并使用student's T检验、用于多重检验的Bonferroni 校正或ANOVA进行组间比较。$P<0.05$被认为是统计学上显著的。

[0157] 结果

[0158] TGFBRII-Fc是由TGFβII型受体的配体结合结构域组成的重组融合 蛋白。在诱导通过CAGA-Luc报告子细胞系测量的TGF-β转录活性方面，TGFBRII-Fc选择性地抑制了TGFβ1和TGFβ3的活性，但不能阻抑或适 度增强TGF-β2的活性(图13A)。相比之下，在BRE-Luc报告子系中，用TGFBRII-Fc处理未抑制BMP介导的转录活性，事实上，在该试验中 增强了多种配体的活性(图13B)。这些结果与该配体捕获剂对TGF-β配 体子集的选择性活性一致，并表明了如下反馈机制，籍此阻抑TGF-β信 号传导可导致增强的BMP和TGF-β2信号传导。一致地，在经培养的人 肺动脉平滑肌细胞(HPASMC)中，TGFBRII-Fc阻止了TGFβ1和TGFβ3 诱导的Smad 2/3磷酸化(图13C)，而不会影响TGFβ2诱导的信号传导。一致地，TGFBRII-Fc在HPASMC中阻止了TGFβ1诱导的信号传导。当 用TGF-β1刺激HPASMC时，通过qRT-PCR测量的平滑肌收缩表型基因 (如钙调素结合蛋白、平滑肌蛋白(smoothelin)，特别是调宁蛋白)的表达增强，所有这些都通过用TGFBRII-Fc对细胞共同处理而被有效地抑 制(图14)。总之，TGFBRII-Fc看起来是TGF-β1和TGF-β3的有效拮抗 剂，并且可以在体外消除它们对血管平滑肌细胞的作用。

[0159] 与先前的报道[30]一致，在大鼠MCT诱导的PAH模型中，我们证实 了PAH的发展与减少的BMPR2/BMP介导的信号传导和全肺中的基因转 录以及TGFβ介导的信号传导和转录方面的显著增加相关。在MCT处理 后3周内，经受MCT的大鼠显示出升高的右心室收缩压(RVSP)和升 高的Fulton's比，与以时间依赖性方式发展的右心脏肥厚(RVH)一致。如先前报道的，MCT暴露导致Pai1和Tgfb1 mRNA水平的渐进性增加。同时，在用MCT处理的大鼠中，Bmpr2和Id1 mRNA的表达降低。通过 Tgfb1和Pai1表达评估的TGFβ信号传导活性的增强与通过RVSP和 Fulton's比率测量的疾病严重性(通过Bmpr2和Id1表达评估的BMP信 号传导活性的损伤)直接相关。

[0160] 我们测试了TGFBRII-Fc可以作为选择性配体捕获剂以抑制体内 TGFβ1/3信号传导活性并调节实验性PAH中的疾病进展的假说。用低剂 量TGFBRII-Fc(5mg/kg，每周两次)的处理显示出RVSP、RVH和小肺 血管的肌肉化降低的非显著趋势，但是显著降低了内侧壁厚度指数，随 后降低了MCT诱导的肺动脉高压。TGFBRII-Fc(15mg/kg，每周两次) 高剂量方案显著降低了RVSP(46.72±4.68vs.32.99±2.08mmHg)以及 RVH(0.52±0.04vs.0.41±0.02)。在该方案下的TGFBRII-Fc处理有效 地防止了MCT大鼠中的血管重塑(图4A至图4M)。接受TGFBRII-Fc 的经MCT处理的大鼠表现出降低的Pai1的mRNA水平，并且出乎意料 地还降低了总的肺提取物中的Tgfb1的水平(图4A至图4M)。在经MCT 处理的大鼠中的Bmpr2和Id1的mRNA水平的降低未受到TGFBRII-Fc 处理的影响。我们还发现TGFBRII-Fc处理减少了MCT大鼠的肺中的Il6、Il1b和Icam(图4A-4M)的mRNA水平。通过小鼠肺切片的免疫组织化

学检测,与TGF-β信号传导活性的增强一致,大鼠的MCT处理与主要 在血管细胞的细胞核中的磷酸化SMAD2的表达增加相关。用 TGFBRII-Fc进行处理减弱了这种增加的磷酸化SMAD2的水平(数据未 示出)。

[0161] 超声心动图评估提供了RVH的替代测量,显示出用TGFBRII-Fc进 行的处理减弱了在第14天于MCT大鼠中观察到的RV游离壁厚度的增 加(0.77±0.15vs.0.59±0.11mm,p<0.05)。我们还观察到MCT大鼠中 的缩短的肺加速时间(PAT)(19.83±2.60vs.32.64±2.16ms,p<0.05), 其未受到TGFBRII-Fc处理的影响。超声心动图M模式和2D评估未显 示作为在正常或经MCT处理的大鼠中给予TGFBRII-Fc的结果的瓣膜功 能障碍或变性的证据。重要的是,无硬化或退化性重塑的证据,用 TGFBRII-Fc进行的处理也与二尖瓣结构的形态学变化无关(图17A至图17B)。在正常或经MCT处理的大鼠中,用TGFBRII-Fc进行处理未改变辅料处理中所见的体重正常增加(图18和图19)。

[0162] 我们在MCT模型中测试了TGFBRII-Fc影响已确立的PAH的能力。在MCT暴露后18天开始TGFBRII-Fc(15mg/kg,每周三次)处理,并 在35天对血液动力学和RVH进行测量。当以这种延迟方式给予时,在 确立了PAH的经MCT处理的大鼠中,TGFBRII-Fc改善了存活率、降低 了RVSP(43.18±3.46vs.33.29±0.77mmHg,p<0.01)和血管重塑(p <0.05)。然而,RVH未受到TGFBRII-Fc延迟处理的影响(0.44±0.03vs. 0.42±0.02)。值得注意的是,以这种方式处理的复苏群组(rescue cohort) 中的血管重塑的改善比起预防群组中观察到的更明显。使用比起预防研 究中所使用的更高剂量的TGFBRII-Fc进行该观察,表明该配体捕获剂在 血管重塑中的治疗潜力是剂量敏感的,并且可以通过滴定(titrating)其 剂量至最佳效果而最大化。我们还发现,TGFBRII-Fc处理降低了MCT 大鼠的肺中的Tgfb1(图15A)、Pai1(图15B)、I16(图15C)、Il1b(图 15D)和Icam(图15E)的mRNA表达。当用TGFBRII-Fc处理确立了 PAH的经MCT处理的大鼠时,观察到主要在血管细胞的核中观察到的 磷酸化SMAD2的减少(数据未示出)。

[0163] 接下来,我们检查了TGFBRII-Fc在SUGEN/低氧模型中的效力。将 小鼠用VEGFR抑制剂SU5416进行处理并暴露至长期低氧下3周,以提 供PAH的机制上不同和互补的模型。在仅暴露至低氧的小鼠中,SUGEN 和低氧的联合处理引发更强健和一致的表型(图20A至图20B)。在经 SUGEN/低氧处理的小鼠中,用TGFBRII-Fc进行的预防性处理显著降低 RVSP(43.38±5.66mmHg vs.35.42±5.85mmHg,p<0.05)和RVH(0.29 ±0.01mmHg vs.0.24±0.02,p<0.05)。TGFBRII-Fc处理减弱了经SUGEN/ 低氧处理的小鼠的肺中的血管重塑(数据未示出)。我们还发现 TGFBRII-Fc处理显示出逆转Tgfb1的上调的趋势(图16A)并且显著降低了SUGEN/低氧小鼠的肺中的Pai1 mRNA水平(图16B)。

[0164] 讨论

[0165] 基于TGFβ信号传导在肺血管功能和疾病中的已知的重要性以及这 些配体的结构和功能多样性,我们尝试确定TGFβ信号传导的选择性抑 制是否可减弱实验性肺高压和肺血管重塑。我们将重组TGFBRII-Fc融合 蛋白表征为TGFβ1和TGFβ3配体信号传导的有效抑制剂,而不影响 TGFβ2的信号传导,TGFβ2是内皮-至-间质转化、细胞外基质重塑和心 脏瓣膜形成的重要调节剂[25,27]。与该活性一致,TGFBRII-Fc通过TGFβ1 和TGFβ3阻断规范的(canonical)SMAD2/3信号传导,并阻止TGFβ1 介导的肺动脉平滑肌细胞在体外从合成转化为收缩表型[31,32]。我们假设 TGFβ1/3主要负责介导PAH中见到的肺血管重塑,并且在两种不

同的 PAH模型中发现TGFBRII-Fc处理矫正了过度的TGFβ信号传导活性并减 弱了肺血管重塑、肺高压和右心室肥厚。重要的是,TGFBRII-Fc不仅预 防了此前已经用野百合碱处理的大鼠中已确立的PAH和RVH的进展，而且还改善了它们的存活率。这些现有数据是选择性抑制TGFβ配体子 集减弱了PAH的首次验证,因此在机理上不同的PAH模型中,使用该 策略可能比非选择性方法更耐受。

[0166] TGFβ家族信号传导分子代表了超过35种多功能细胞因子的结构多 样的组,所述多功能细胞因子调节许多不同细胞类型(除了TGFβ1-3外，包括BMP、活化素、抑制素、生长和分化因子(GDF)、lefty、Nodal和 抗缪勒管激素)的分化、增殖、迁移和存活。TGFβ型配体在胚胎形成期 间协调了许多过程,并且在血管和纤维化疾病中发现的病理生理学重塑 中发挥关键作用,发挥了在治疗应用的阻断中产生极大的兴趣的作用[20,33-37]。非选择性阻断TGFβ信号传导已显示有助于大鼠中野百合碱诱导的 PAH。小分子抑制剂IN-1333、SD-208和SB-525334通过经由其I型受 体ALK5的活性来抑制TGFβ信号传导而减弱野百合碱诱导的PAH[13,17,30]。然而,所有这些分子展示出对密切相关的I型受体ALK4和ALK7的 潜在活性[38-40],并且不仅影响TGFβ1-3的活性,而且可能影响20种其它 配体(其功能可能与血管系统中的TGFβ一致或可能不一致的配体,包 括活化素、GDF和Nodal)的活性。此外,这些有效的TGFβ抑制剂在 动物中看起来具有引起出血性瓣膜坏死的广谱作用[18],可能是由于它们 缺乏选择性,并存在对它们在人中的使用提出了挑战。泛TGFβ1-3中和 抗体1D11也已经在减轻野百合碱诱导的PAH中起效[20,39]。

[0167] 基于经处理的动物与未经处理的动物的超声心动图和组织学分析，给予TGFBRII-Fc不会影响心脏瓣膜的功能或结构。不考虑非选择性策略 在耐受性方面可能的限制。改善肺血管重塑的这些不同的策略的整合 (concordance)是这种信号传导轴在PAH中的作用的强有力证据,然而，在临床上推进这一概念存在多个限制。

[0168] 这些现有研究的显著限制依赖于野百合碱诱导的PAH的一个临床前 模型。大鼠中MCT诱导的PAH的肺具有扩大的TGF-β信号传导和促纤 维化转录活性、阻抑BMPR2的表达和下游BMP信号传导活性的分子标 记[30],以及弥漫性炎症和肺损伤的证据[41],如同我们在当前研究中发现 的,可能使它们特别顺从于(amenable to)TGFβ配体阻断。虽然MCT-PAH 的分子谱与某些类型的人类PAH疾病的分子谱相似,但对了解TGFβ拮 抗作用是否可推广到其它模型是有帮助的。当我们检查TGFBRII-Fc在机 理上不同的SUGEN-低氧诱导的小鼠的PAH模型中的影响时,如最近由 其他研究者验证的[42、43],我们发现TGFβ转录靶标(如Pai1)的表达增 加,但低于在经MCT处理的大鼠中见到的程度。尽管如此,用TGFBRII-Fc 处理这些动物还可以改善PA压力和RV肥厚。

[0169] 针对ALK5的小分子抑制剂的临床部署受到了毒性的限制。TGFβ2 信号传导对于心脏瓣膜形态发生是必需的,与其在各种组织中的调节内 皮-至-间质和上皮-至-间质转化方面的核心作用一致[21-29]。与在缺乏III 型共受体β聚糖的情况下的天然TGF-βII型受体不转导TGFβ2信号的观 念[44-46]一致,可溶性TGFBRII-Fc在体外不影响TGFβ2诱导的信号传导,并且当对小鼠和大鼠长期以足以减轻PAH的剂量给予时,TGFBRII-Fc 不会引起心脏瓣膜结构或功能的任何可观察到的变化,或不会引起以前 用非选择性TGFβ拮抗剂观察到的死亡率的任何增加。相反,作为复苏 研究中的终点,用TGFBRII-Fc进行处理被良好耐受并且改善了死亡率。

[0170] PAH由涉及多种细胞类型的肺血管重塑引起。与来自Thomas和同 事的观察一致，我们观察到共同定位于MCT大鼠的肺中的单核细胞的磷 酸-Smad2染色增加[17]。还显示出，浸润至MCT大鼠的受影响的肺中的 CD68阳性细胞有助于TGF-β1的过量产生[30]。不希望受理论的束缚，总 之，这些数据表明浸润细胞可以是在实验性PAH中响应于过度的TGF-β 信号传导活性的原代细胞类型。我们的数据显示出，TGFβ1在体外调节 了SMC表型，调节SMC表型是由TGFBRII-Fc逆转的过程。

[0171] 本文提供了显示出可溶性TGF-βII型受体作为针对TGF-β1/3的选择 性配体捕获剂的数据，减轻了血管重塑并改善了同时伴有血管损伤和已 确立的疾病的PAH。不同于以前的方法，这种选择性配体捕获剂的给予 不会引起心脏瓣膜或其它毒性。因此，特异性TGF-β配体的选择性配体 捕获剂可能是治疗人PAH的有效且可耐受的方法。

[0172] 参考文献

[0173] 1.Megalou AJ,Glava C,Oikonomidis DL,Vilaeti A,Agelaki MG, Baltogiannis GG,Papalois A,Vlahos AP,Kolettis TM,Transforming growth factor-beta inhibition attenuates pulmonary arterial hypertension in rats.Int J Clin Exp Med.2010;3:332-340

[0174] 2.Strelau J,Schober A,Sullivan A,Schilling L,Unsicker K. Growth/differentiation factor-15(gdf-15),a novel member of the tgf-beta superfamily, promotes survival of lesioned mesencephalic dopaminergic neurons in vitro and in vivo and is induced in neurons following cortical lesioning.J Neural Transm Suppl.2003:197-203

[0175] 3.Deng Z,Morse JH,Slager SL,Cuervo N,Moore KJ,Venetos G, Kalachikov S,Cayanis E,Fischer SG,Barst RJ,Hodge SE,Knowles JA.Familial primary pulmonary hypertension(gene pph1)is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-ii gene.Am J Hum Genet.,2000;67:737-744

[0176] 4.Lane KB,Machado RD,Pauciulo MW,Thomson JR,Phillips JA,3rd, Loyd JE, Nichols WC,Trembath RC.Heterozygous germline mutations in bmpr2,encoding a tgf-beta receptor,cause familial primary pulmonary hypertension.,The international pph consortium.Nat Genet.2000;26: 81-84

[0177] 5.Waite KA,Eng C.From developmental disorder to heritable cancer:It's all in the bmp/tgf-beta family.Nat Rev Genet.2003;4:763-773

[0178] 6.Yu PB,Deng DY,Beppu H,Hong CC,Lai C,Hoyng SA,Kawai N, Bloch KD.Bone morphogenetic protein(bmp)type ii receptor is required for bmp-mediated growth arrest and differentiation in pulmonary artery smooth muscle cells.J Biol Chem.2008;283:3877-3888

[0179] 7.Rudarakanchana N,Flanagan JA,Chen H,Upton PD,Machado R, Patel D, Trembath RC,Morrell NW.Functional analysis of bone morphogenetic protein type ii receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension.Hum Mol Genet.2002;11:1517-1525

[0180] 8.Yu PB,Beppu H,Kawai N,Li E,Bloch KD.Bone morphogenetic protein

(bmp)type ii receptor deletion reveals bmp ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells.J Biol Chem.2005; 280:24443-24450

[0181] 9.Moon JS,Oh SH,Jeong YW,Kang JH,Park JC,Son HJ,Bae S, Park BI,Kim MS,Koh JT,Kim SH,Ko HM.Relaxin augments bmp 2-induced osteoblast differentiation and bone formation.J Bone Miner Res.2014

[0182] 10.Eggers KM,Kempf T,Lagerqvist B,Lindahl B,Olofsson S,Jantzen F, Peter T,Allhoff T,Siegbahn A,Venge P,Wollert KC,Wallentin L.Growth-differentiation factor-15 for long-term risk prediction in patients stabilized after an episode of non-st-segment-elevation acute coronary syndrome.Circ Cardiovasc Genet.2010;3:88-96

[0183] 11.Tuder RM,Davis LA,Graham BB.Targeting energetic metabolism:A new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension.Am J Respir Crit Care Med.2012;185:260-266

[0184] 12.Botney MD,Bahadori L,Gold LI.Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension.Potential role for transforming growth factor-beta.Am J Pathol.1994;144:286-295

[0185] 13.Zaiman AL,Podowski M,Medicherla S,Gordy K,Xu F,Zhen L, Shimoda LA, Neptune E,Higgins L,Murphy A,Chakravarty S,Protter A,Sehgal PB,Champion HC, Tuder RM.Role of the tgf-beta/alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med.2008;177:896-905

[0186] 14.Chen YF,Feng JA,Li P,Xing D,Zhang Y,Serra R,Ambalavanan N,Majid-Hassan E,Oparil S.Dominant negative mutation of the tgf-beta receptor blocks hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling.J Appl Physiol.2006;100:564-571

[0187] 15.Sheares KK,Jeffery TK,Long L,Yang X,Morrell NW.Differential effects of tgf-beta1 and bmp-4 on the hypoxic induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary artery smooth muscle cells.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2004;287:L919-927

[0188] 16.Graham BB,Chabon J,Gebreab L,Poole J,Debella E,Davis L,Tanaka T, Sanders L,Dropcho N,Bandeira A,Vandivier RW,Champion HC, Butrous G,Wang XJ, Wynn TA,Tuder RM.Transforming growth factor-beta signaling promotes pulmonary hypertension caused by schistosoma mansoni.Circulation.2013;128:1354-1364

[0189] 17.Thomas M,Docx C,Holmes AM,Beach S,Duggan N,England K, Leblanc C, Lebret C,Schindler F,Raza F,Walker C,Crosby A,Davies RJ,Morrell NW,Budd DC.Activin-like kinase 5(alk5)mediates abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells from patients with familial pulmonary arterial hypertension and is involved in the progression of experimental pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline.Am J Pathol.2009;174:380-389

[0190] 18.Anderton MJ,Mellor HR,Bell A,Sadler C,Pass M,Powell S,Steele SJ, Roberts RR,Heier A.Induction of heart valve lesions by small-molecule alk5

inhibitors.Toxicol Pathol.2011;39:916-924

[0191] 19.Megalou AJ,Glava C,Vilaeti AD,Oikonomidis DL,Baltogiannis GG, Papalois A,Vlahos AP,Kolettis TM.Transforming growth factor-beta inhibition and endothelin receptor blockade in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension.Pulm Circ.2012;2: 461-469

[0192] 20.Grafe I,Yang T,Alexander S,Homan EP,Lietman C,Jiang MM, Bertin T, Munivez E,Chen Y,Dawson B,Ishikawa Y,Weis MA, Sampath TK,Ambrose C,Eyre D, Bachinger HP,Lee B.Excessive transforming growth factor-beta signaling is a common mechanism in osteogenesis imperfecta.Nature medicine.2014;20:670-675

[0193] 21.Shin JA,Hong OK,Lee HJ,Jeon SY,Kim JW,Lee SH,Cho JH, Lee JM,Choi YH,Chang SA,Son HY,Kim JH,Yoon KH.Transforming growth factor-beta induces epithelial to mesenchymal transition and suppresses the proliferation and transdifferentiation of cultured human pancreatic duct cells.J Cell Biochem.2011;112:179-188

[0194] 22.Azhar M,Runyan RB,Gard C,Sanford LP,Miller ML,Andringa A, Pawlowski S,Rajan S,Doetschman T.Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development.Developmental dynamics:an official publication of the American Association of Anatomists.2009;238:431-442

[0195] 23.Camenisch TD,Molin DG,Person A,Runyan RB,Gittenberger-de Groot AC, McDonald JA,Klewer SE.Temporal and distinct tgfbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis.Dev Biol.2002;248: 170-181

[0196] 24.Saito RA,Watabe T,Horiguchi K,Kohyama T,Saitoh M,Nagase T, Miyazono K.Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells.Cancer Res.2009;69:2783-2791

[0197] 25.Kokudo T,Suzuki Y,Yoshimatsu Y,Yamazaki T,Watabe T,Miyazono K.Snail is required for tgfbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells.Journal of cell science.2008; 121:3317-3324

[0198] 26.Townsend TA,Robinson JY,Deig CR,Hill CR,Misfeldt A,Blobe GC, Barnett JV.Bmp-2 and tgfbeta2 shared pathways regulate endocardial cell transformation.Cells Tissues Organs.2011;194:1-12

[0199] 27.Azhar M,Brown K,Gard C,Chen H,Rajan S,Elliott DA,Stevens MV, Camenisch TD,Conway SJ,Doetschman T.Transforming growth factor beta2 is required for valve remodeling during heart development. Developmental dynamics:an official publication of the American Association of Anatomists.2011;240:2127-2141

[0200] 28.Townsend TA,Robinson JY,How T,DeLaughter DM,Blobe GC, Barnett JV.Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires type iii tgfbeta receptor interaction with gipc.Cell Signal.2012; 24:247-256

[0201] 29.Medici D,Shore EM,Lounev VY,Kaplan FS,Kalluri R,Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. Nature medicine.2010;16:1400-1406

[0202] 30.Long L,Crosby A,Yang X,Southwood M,Upton PD,Kim DK, Morrell NW.Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: Potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease.Circulation.2009;119:566-576

[0203] 31.Davis BN,Hilyard AC,Lagna G,Hata A.Smad proteins control drosha-mediated microrna maturation.Nature.2008;454:56-61

[0204] 32.King KE,Iyemere VP,Weissberg PL,Shanahan CM.Kruppel-like factor 4 (klf4/gklf)is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype.The Journal of biological chemistry.2003;278:11661-11669

[0205] 33.Cohn RD,van Erp C,Habashi JP,Soleimani AA,Klein EC,Lisi MT, Gamradt M,ap Rhys CM,Holm TM,Loeys BL,Ramirez F,Judge DP, Ward CW,Dietz HC.Angiotensin ii type 1 receptor blockade attenuates tgf-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states.Nature medicine.2007;13:204-210

[0206] 34.Ng CM,Cheng A,Myers LA,Martinez-Murillo F,Jie C,Bedja D, Gabrielson KL,Hausladen JM,Mecham RP,Judge DP,Dietz HC. Tgf-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of marfan syndrome.The Journal of clinical investigation.2004; 114:1586-1592

[0207] 35.Gallo EM,Loch DC,Habashi JP,Calderon JF,Chen Y,Bedja D, van Erp C, Gerber EE,Parker SJ,Sauls K,Judge DP,Cooke SK, Lindsay ME,Rouf R,Myers L,ap Rhys CM,Kent KC,Norris RA,Huso DL,Dietz HC.Angiotensin ii-dependent tgf-beta signaling contributes to loeys-dietz syndrome vascular pathogenesis.The Journal of clinical investigation.2014;124:448-460

[0208] 36.Wu CF,Chiang WC,Lai CF,Chang FC,Chen YT,Chou YH,Wu TH, Linn GR, Ling H,Wu KD,Tsai TJ,Chen YM,Duffield JS,Lin SL. Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis.Am J Pathol.2013;182: 118-131

[0209] 37.Ling H,Roux E,Hempel D,Tao J,Smith M,Lonning S,Zuk A, Arbeeny C, Ledbetter S.Transforming growth factor beta neutralization ameliorates pre-existing hepatic fibrosis and reduces cholangiocarcinoma in thioacetamide-

treated rats.PLoS One.2013;8:e54499

[0210] 38.Grygielko ET,Martin WM,Tweed C,Thornton P,Harling J,Brooks DP, Laping NJ.Inhibition of gene markers of fibrosis with a novel inhibitor of transforming growth factor-beta type i receptor kinase in puromycin-induced nephritis.The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.2005;313: 943-951

[0211] 39.Kim DK,Sheen YY,Jin CH,Park CY,Sreenu D,Rao KS,Krishnaiah M, Subrahmanyam VB.2-pyridyl substituted imidazoles as therapeutic alk5 and/or alk4 inhibitors.World Intellectual Property Organization. 2011;US20110319406 A1

[0212] 40.Loots GG,Keller H,Leupin O,Murugesh D,Collette NM,Genetos DC. Tgf-beta regulates sclerostin expression via the ecr5 enhancer.Bone. 2012;50:663-669

[0213] 41.Gomez-Arroyo JG,Farkas L,Alhussaini AA,Farkas D,Kraskauskas D, Voelkel NF,Bogaard HJ.The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2012; 302:L363-369

[0214] 42.Ciuclan L,Bonneau O,Hussey M,Duggan N,Holmes AM,Good R, Stringer R,Jones P,Morrell NW,Jarai G,Walker C,Westwick J, Thomas M.A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension.American journal of respiratory and critical care medicine. 2011;184:1171-1182

[0215] 43.Bertero T,Lu Y,Annis S,Hale A,Bhat B,Saggar R,Wallace WD, Ross DJ, Vargas SO,Graham BB,Kumar R,Black SM,Fratz S,Fineman JR,West JD,Haley KJ, Waxman AB,Chau BN,Cottrill KA,Chan SY. Systems-level regulation of microrna networks by mir-130/301promotes pulmonary hypertension.The Journal of clinical investigation.2014; 124:3514-3528

[0216] 44.Esparza-Lopez J,Montiel JL,Vilchis-Landeros MM,Okadome T, Miyazono K,Lopez-Casillas F.Ligand binding and functional properties of betaglycan,a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily.Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin a.The Journal of biological chemistry.2001;276: 14588-14596

[0217] 45.Brown CB,Boyer AS,Runyan RB,Barnett JV.Requirement of type iii tgf-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart.Science. 1999;283:2080-2082

[0218] 46.Blobe GC,Schiemann WP,Pepin MC,Beauchemin M,Moustakas A, Lodish HF,O'Connor-McCourt MD.Functional roles for the cytoplasmic domain of the type iii transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling.The Journal of biological chemistry.2001;276: 24627-24637

[0219] SEQ ID NO:1人GDF-15 NCBI Ref Seq:NP_004855

[0220]

1 mpgqelrtvn gsqmllvllv lswlphggal slaeasrasf pgpselhsed srfrelrkry
61 edlltrlran qswedsntdl vpapavrilt pevrlgsggh lhlrisraal peglpeasrl
121 hralfrlspt asrswdvtrp lrrqlslarp qapalhlrls pppsqsdqll aesssarpql
181 elhlrpqaar grrrararng dhcplgpgrc crlhtvrasl edlgwadwvl sprevqvtmc
241 igacpsqfra anmhaqikts lhrlkpdtvp apccvpasyn pmvliqktdt gvslqtyddl

301 lakdchci

[0221] SEQ ID NO:2人TGFβ1 NCBI Ref Seq:NP_000651

[0222]

1 mppsglrllp lllpllwllv ltpgrpaagl stcktidmel vkrkrieair gqilsklrla
61 sppsqgevpp gplpeavlal ynstrdrvag esaepepepe adyyakevtr vlmvethnei
121 ydkfkqsths iymffntsel reavpepvll sraelrllrl klkveqhvel yqkysnnswr
181 ylsnrllaps dspewlsfdv tgvvrqwlsr ggeiegfrls ahcscdsrdn tlqvdingft
241 tgrrgdlati hgmnrpflll matpleraqh lqssrhrral dtnycfsste knccvrqlyi
301 dfrkdlgwkw ihepkgyhan fclgpcpyiw sldtqyskvl alynqhnpga saapccvpqa
361 leplpivyyv grkpkveqls nmivrsckcs

[0223] SEQ ID NO:3人TGFβ3 NCBI Ref Seq:NP_003230

[0224]

1 mkmhlqralv vlallnfatv slslstcttl dfghikkkrv eairgqilsk lrltsppept
61 vmthvpyqvl alynstrell eemhgereeg ctqentesey yakeihkfdm iqglaehnel
121 avcpkgitsk vfrfnvssve knrtnlfrae frvlrvpnps skrneqriel fqilrpdehi
181 akqryiggkn lptrgtaewl sfdvtdtvre wllrresnlg leisihcpch tfqpngdile
241 nihevmeikf kgvdneddhg rgdlgrlkkq kdhhnphlil mmipphrldn pgqggqrkkr
301 aldtnycfrn leenccvrpl yidfrqdlgw kwvhepkgyy anfcsgpcpy lrsadtthst
361 vlglyntlnp easaspccvp qdlepltily yvgrtpkveq lsnmvvksck cs

[0225] SEQ ID NO:4人TGFBR2 NCBI Ref Seq:NP_001020018

[0226]

```
       1 mgrgllrglw plhivlwtri astipphvqk sdvemeaqkd eiicpscnrt
ahplrhinnd
       61 mivtdnngav kfpqlckfcd vrfstcdnqk scmsncsits icekpqevcv
avwrkndeni
      121 tletvchdpk lpyhdfiled aaspkcimke kkkpgetffm cscssdecnd
niifseeynt
      181 snpdlllvif qvtgisllpp lgvaisviii fycyrvnrqq klsstwetgk
trklmefseh
      241 caiileddrs disstcanni nhntellpie ldtlvgkgrf aevykaklkq
ntseqfetva
      301 vkifpyeeya swktekdifs dinlkhenil qfltaeerkt elgkqywlit
afhakgnlqe
      361 yltrhviswe dlrklgssla rgiahlhsdh tpcgrpkmpi vhrdlkssni
lvkndltccl
      421 cdfglslrld ptlsvddlan sgqvgtarym apevlesrmn lenvesfkqt
dvysmalvlw
      481 emtsrcnavg evkdyeppfg skvrehpcve smkdnvlrdr grpeipsfwl
nhqgiqmvce
      541 tltecwdhdp earltaqcva erfselehld rlsgrscsee kipedgslnt tk
```

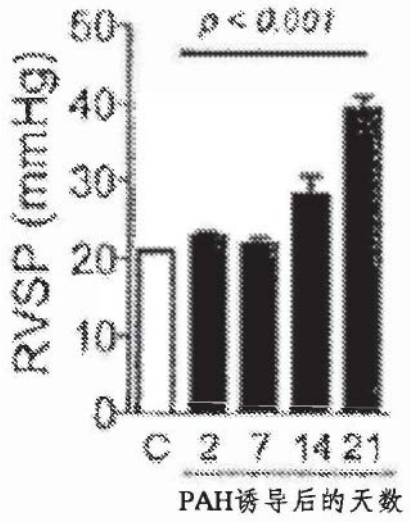

p < 0.001
RVSP (mmHg)
60
40
30
20
10
0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1A

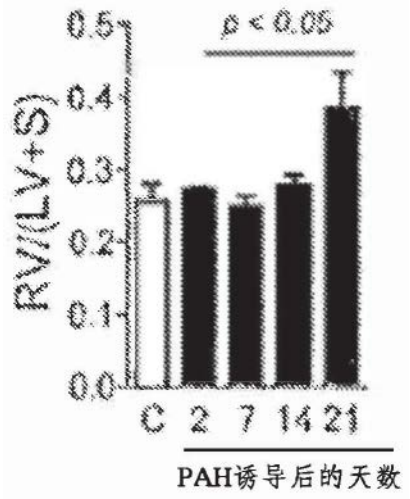

p < 0.05
RV/(LV+S)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1B

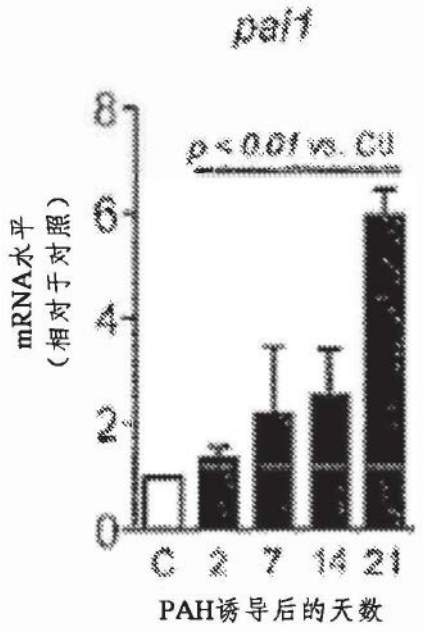

pai1
p < 0.01 vs. Cu
mRNA水平
（相对于对照）
8
6
4
2
0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1C

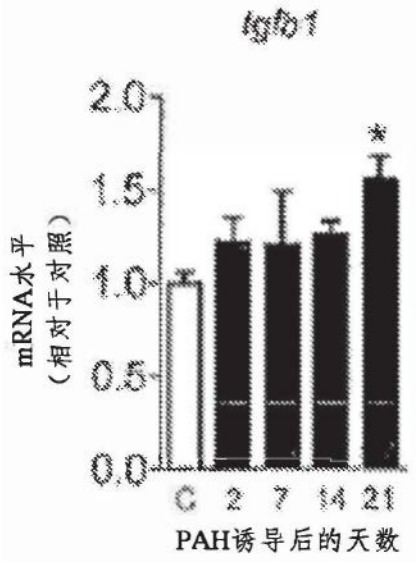

hgb1
*
mRNA水平
（相对于对照）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1D

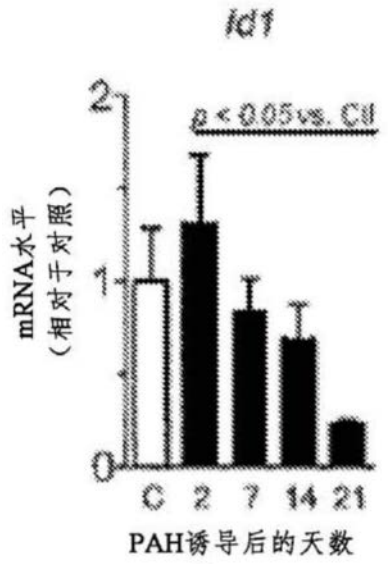

Id1
p < 0.05 vs. CII
mRNA水平
（相对于对照）
2
1
0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1E

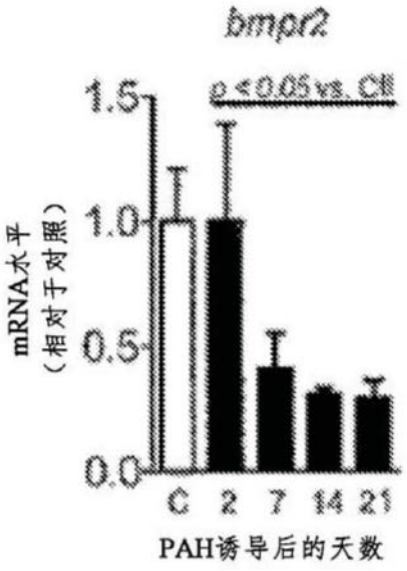

bmpr2
p ≤ 0.05 vs. CII
mRNA水平
（相对于对照）
1.5
1.0
0.5
0.0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1F

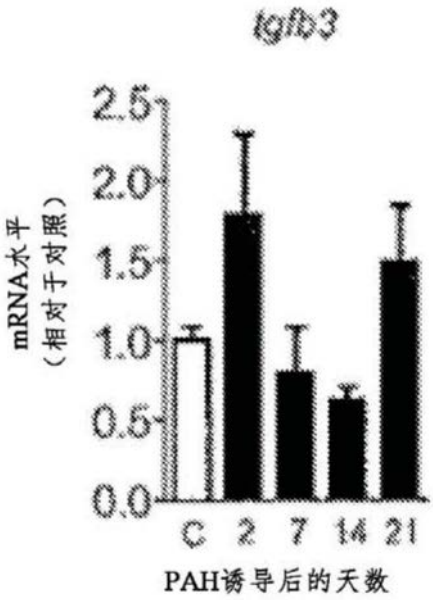

tgfb3
mRNA水平
（相对于对照）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1G

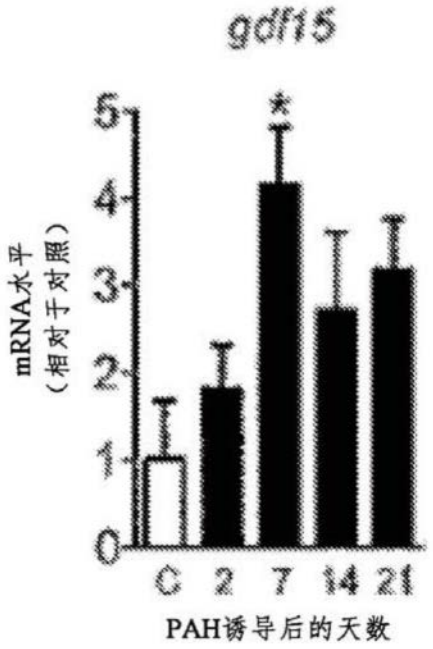

gdf15
mRNA水平
（相对于对照）
5
4
3
2
1
0
*
C 2 7 14 21
PAH诱导后的天数

图1H

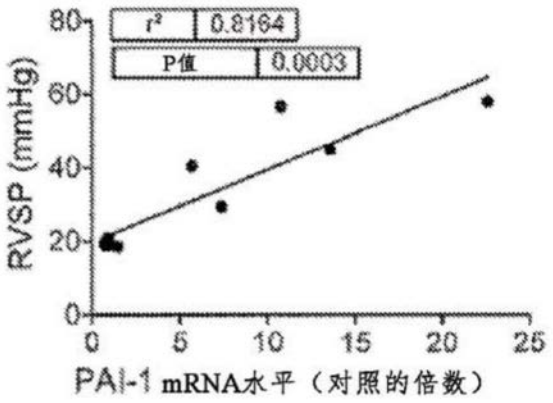

r² 0.8164
P值 0.0003
RVSP (mmHg)
0
20
40
60
80
0
5
10
15
20
25
PAI-1 mRNA水平（对照的倍数）

图2A

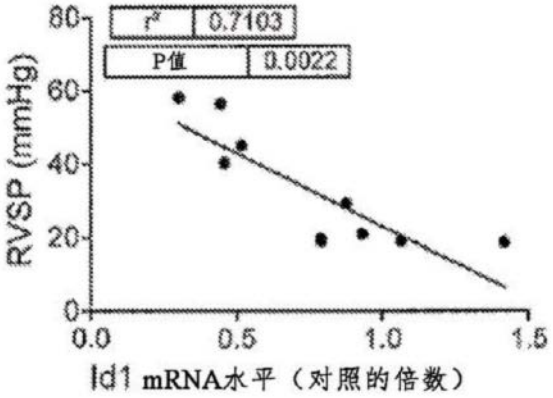

r² 0.7103
P值 0.0022
RVSP (mmHg)
0
20
40
60
80
0.0
0.5
1.0
1.5
Id1 mRNA水平（对照的倍数）

图2B

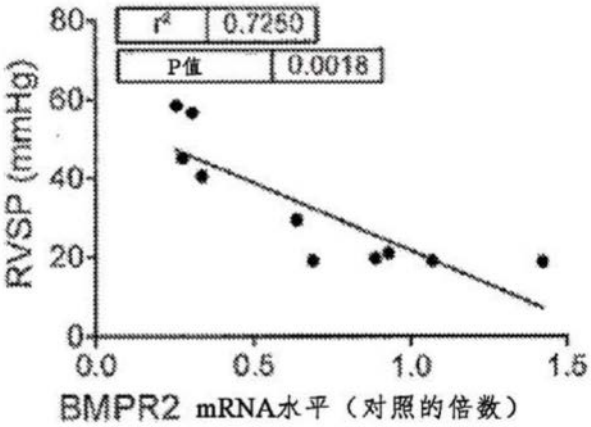

r² 0.7250
P值 0.0018
RVSP (mmHg)
0
20
40
60
80
0.0
0.5
1.0
1.5
BMPR2 mRNA水平（对照的倍数）

图2C

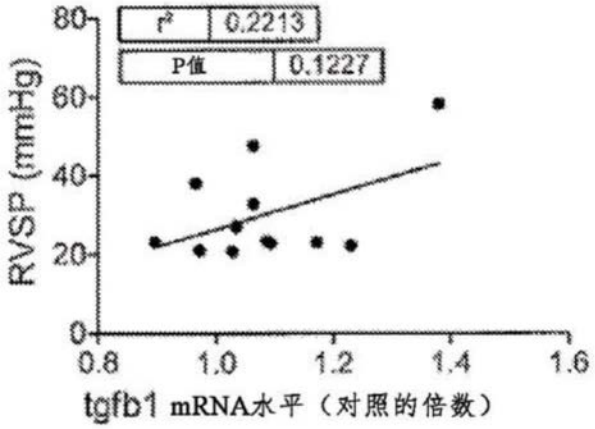

r² 0.2213
P值 0.1227
RVSP (mmHg)
80
60
40
20
0
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
tgfb1 mRNA水平（对照的倍数）

图2D

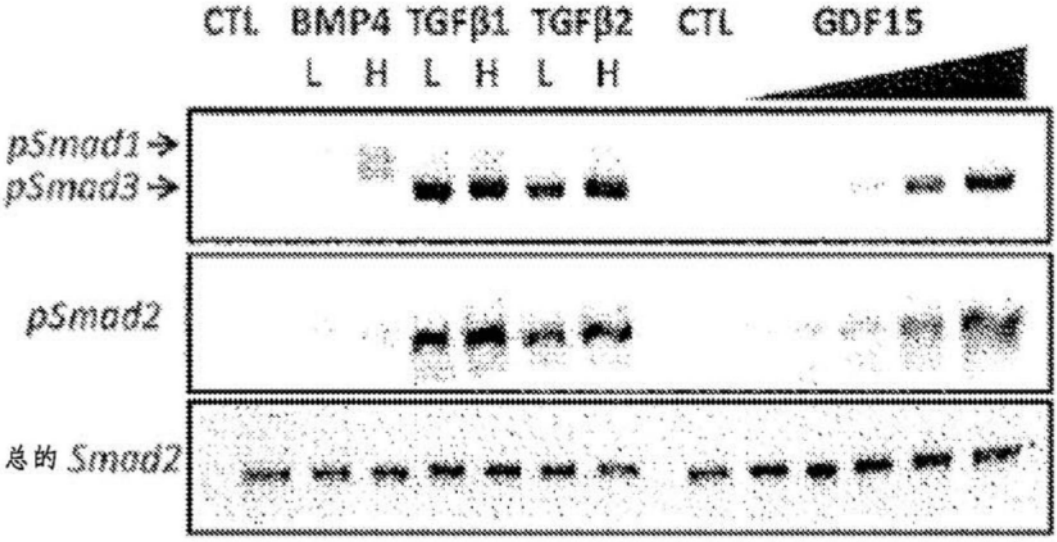

CTL
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
CTL
GDF15
L H L H L H
pSmad1
pSmad3
pSmad2
总的 Smad2

图3A


BMP9
TGFβ1
TGFβ2
C
GDF15
pSmad1
pSmad3
总的 Smad3

图3B

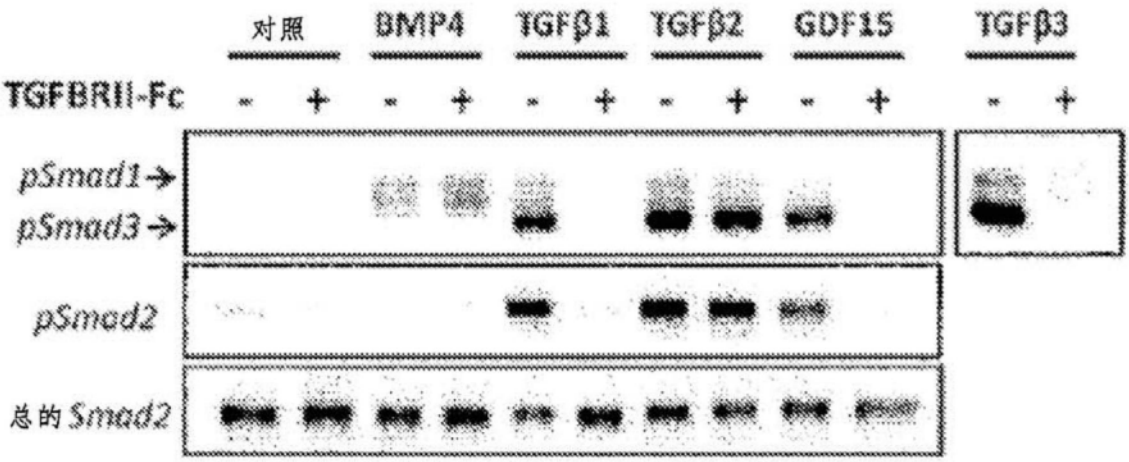

对照
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
GDF15
TGFβ3
TGFBRII-Fc
- + - + - + - + - + - +
pSmad1→
pSmad3→
pSmad2
总的Smad2

图3C

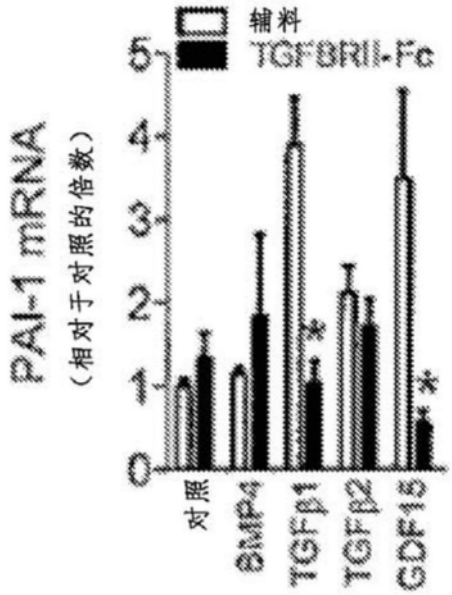

辅料
TGFBRII-Fc
PAI-1 mRNA
（相对于对照的倍数）
0
1
2
3
4
5
*
*
对照
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
GDF15

图3D

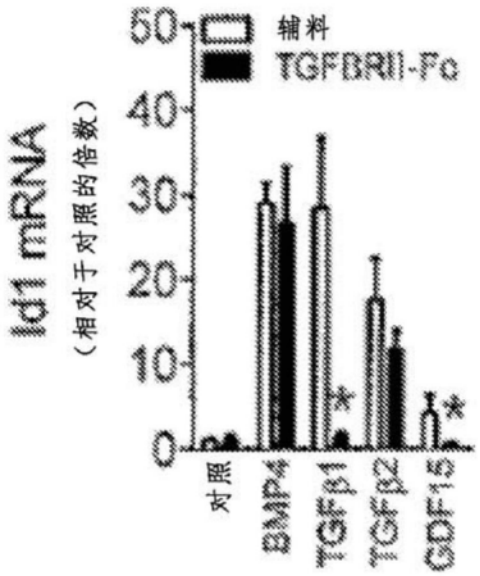

辅料
TGFBRII-Fc
Id1 mRNA
（相对于对照的倍数）
50
40
30
20
10
0
*
*
对照
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
GDF15

图3E

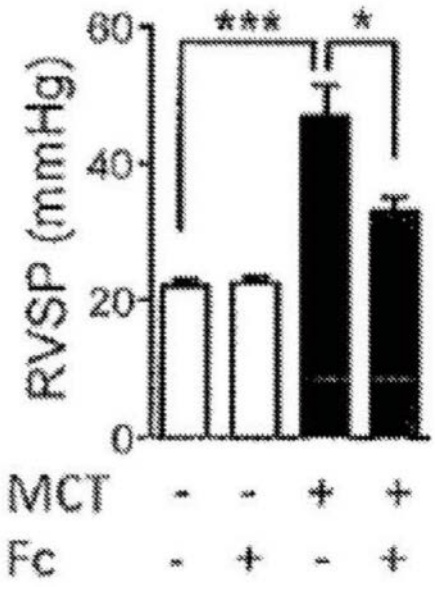

***
*
RVSP (mmHg)
60
40
20
0
MCT - - + +
Fc - + - +

图4A

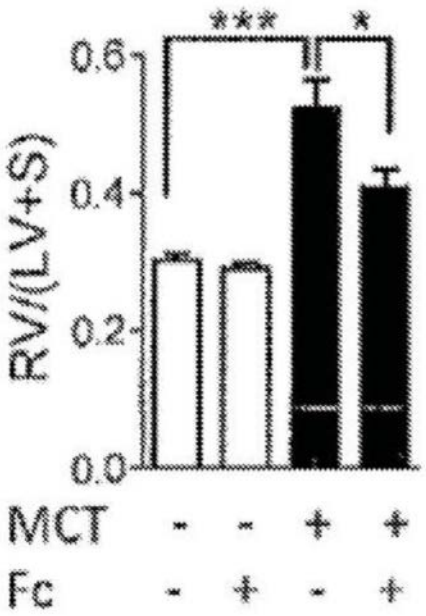


图4B

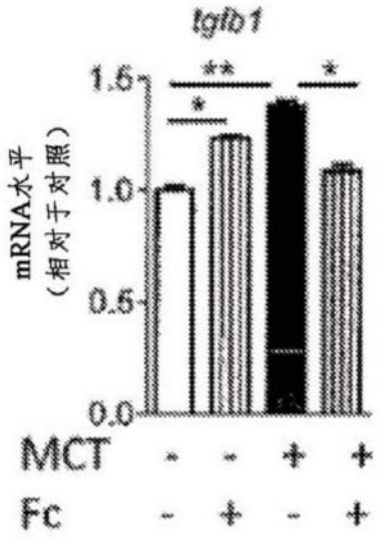


图4C

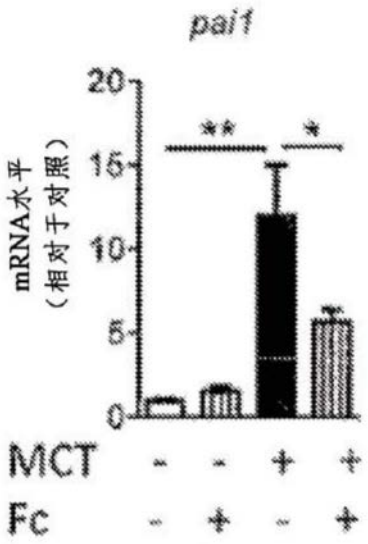

pai1
20
15
10
5
0
mRNA水平
（相对于对照）
**
*
MCT - - + +
Fc - + - +

图4D

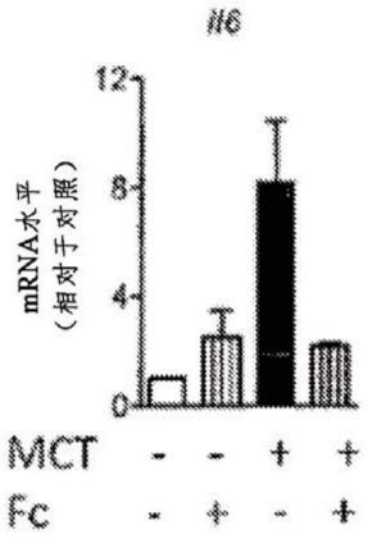

il6
12
8
4
0
mRNA水平
（相对于对照）
MCT - - + +
Fc - + - +

图4E

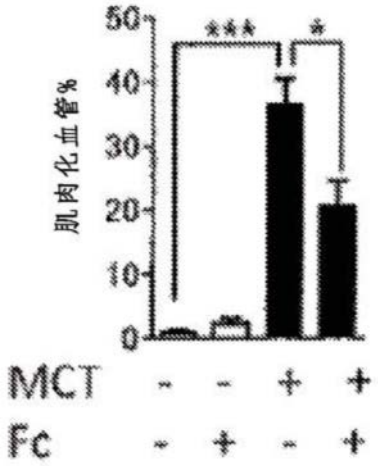

肌肉化血管%
50
40
30
20
10
0
***
*
MCT - - + +
Fc - + - +

图4F

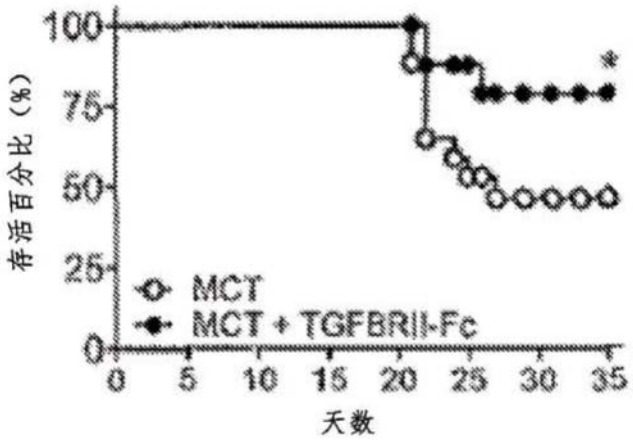

存活百分比（%）
100
75
50
25
0
*
MCT
MCT + TGFBRII-Fc
0 5 10 15 20 25 30 35
天数

图4G

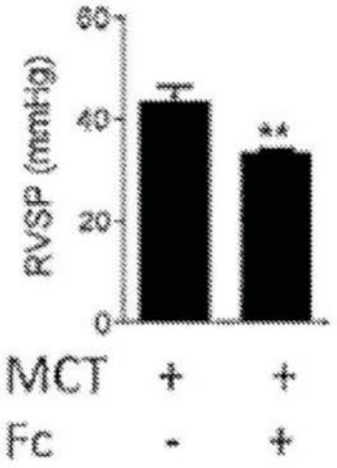

RVSP (mmHg)
60
40
20
0
**
MCT + +
Fc - +

图4H

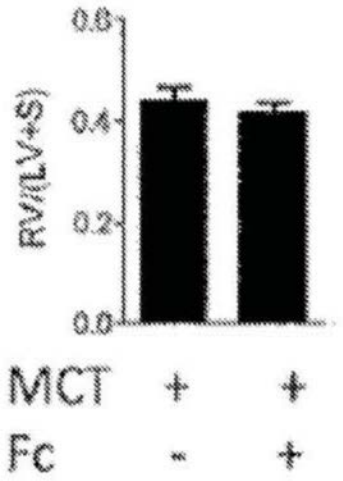


图4I

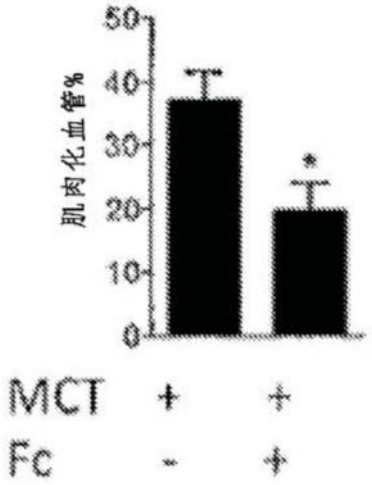


图4J

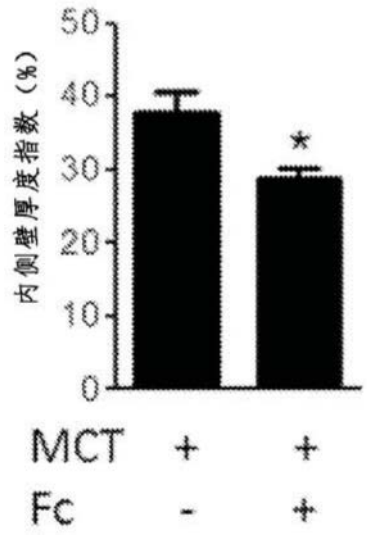

内侧壁厚度指数（%）
50
40
30
20
10
0
*
MCT + +
Fc - +

图4K

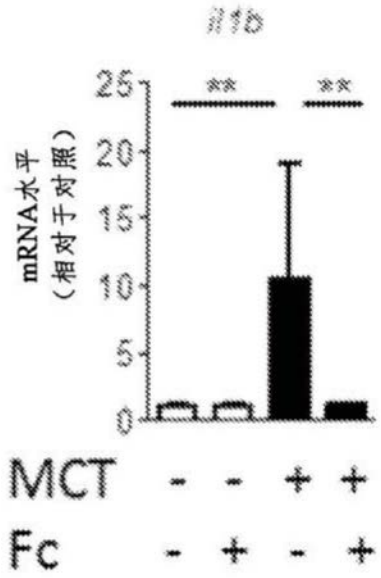

Il1b
mRNA水平
（相对于对照）
25
20
15
10
5
0
**
**
MCT - - + +
Fc - + - +

图4L

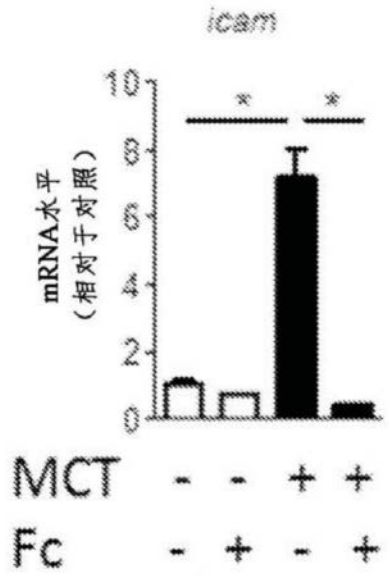

icam
mRNA水平
（相对于对照）
10
8
6
4
2
0
*
*
MCT - - + +
Fc - + - +

图4M

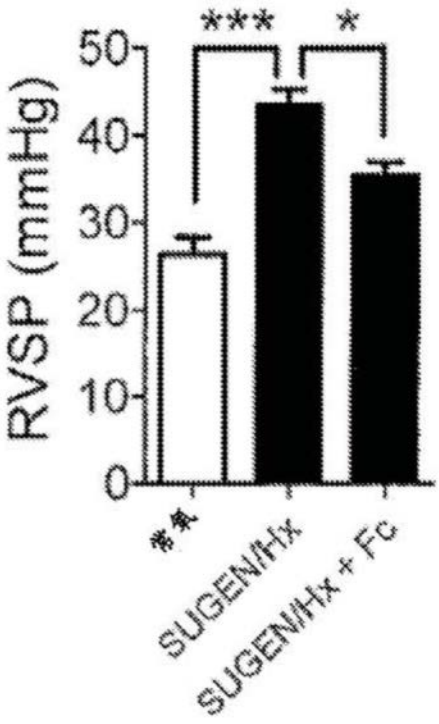

RVSP (mmHg)
50
40
30
20
10
0
***
*
常氧
SUGEN/Hx
SUGEN/Hx + Fc

图5A

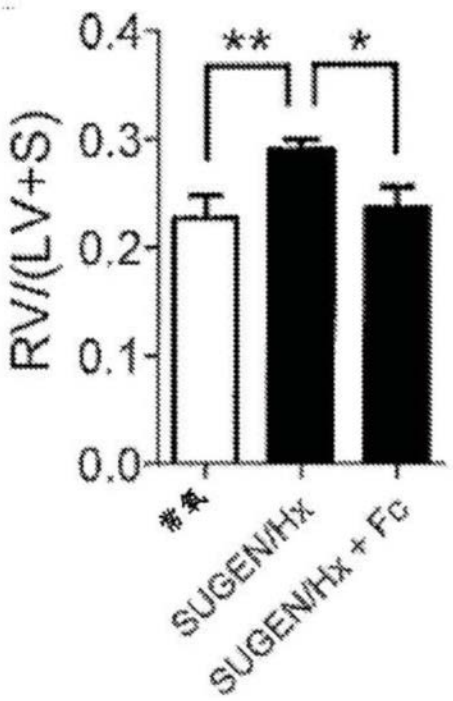

RV/(LV+S)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
*
常氧
SUGEN/Hx
SUGEN/Hx + Fc

图5B

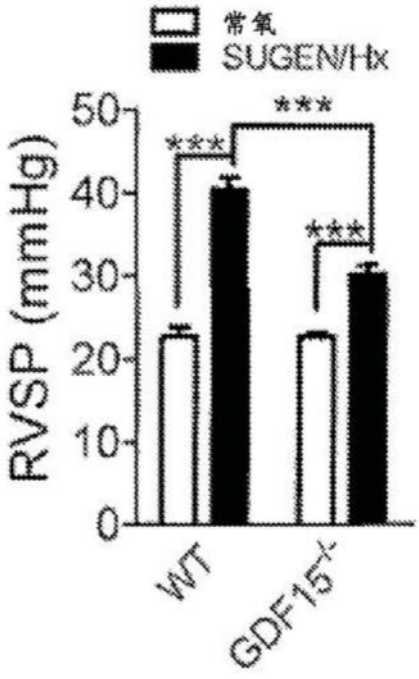

常氧
SUGEN/Hx
RVSP (mmHg)
50
40
30
20
10
0
***
***
***
WT
GDF15-/-

图6A

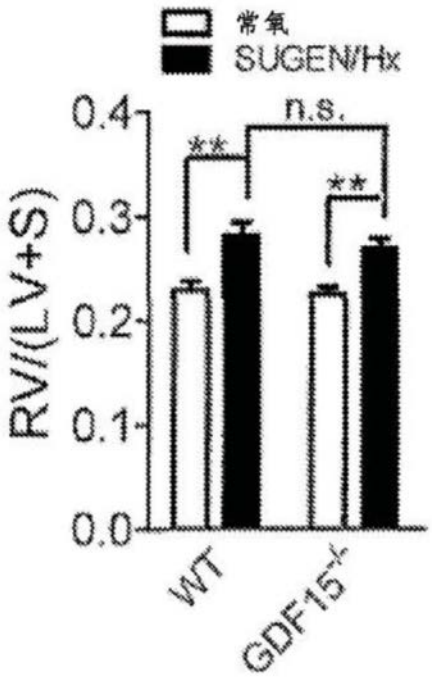

常氧
SUGEN/Hx
RV/(LV+S)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
n.s.
**
**
WT
GDF15-/-

图6B

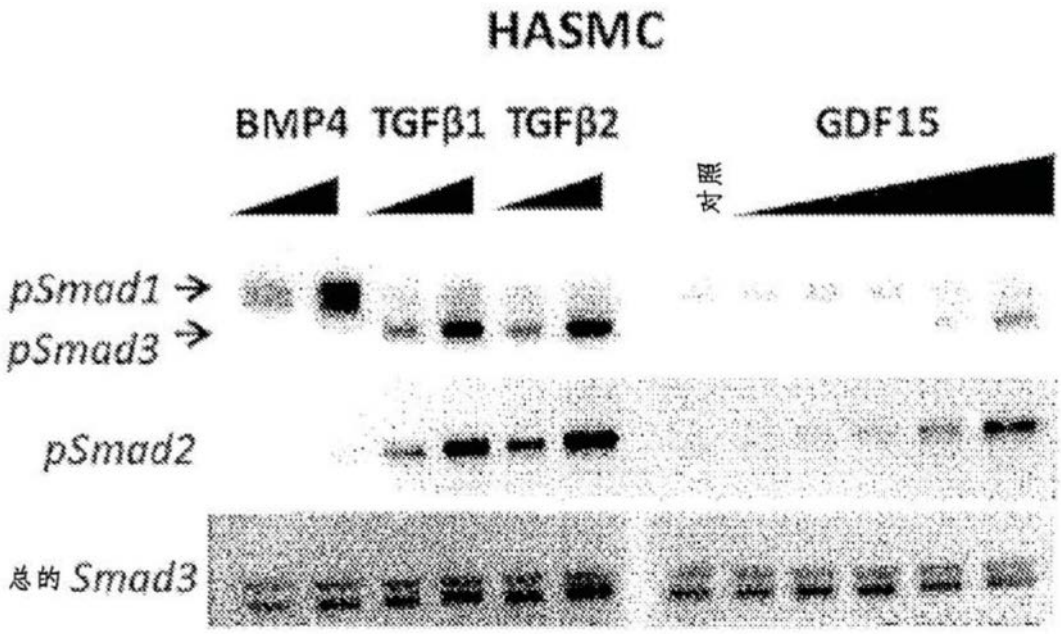

HASMC
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
GDF15
剂量
pSmad1
pSmad3
pSmad2
总的 Smad3

图7A

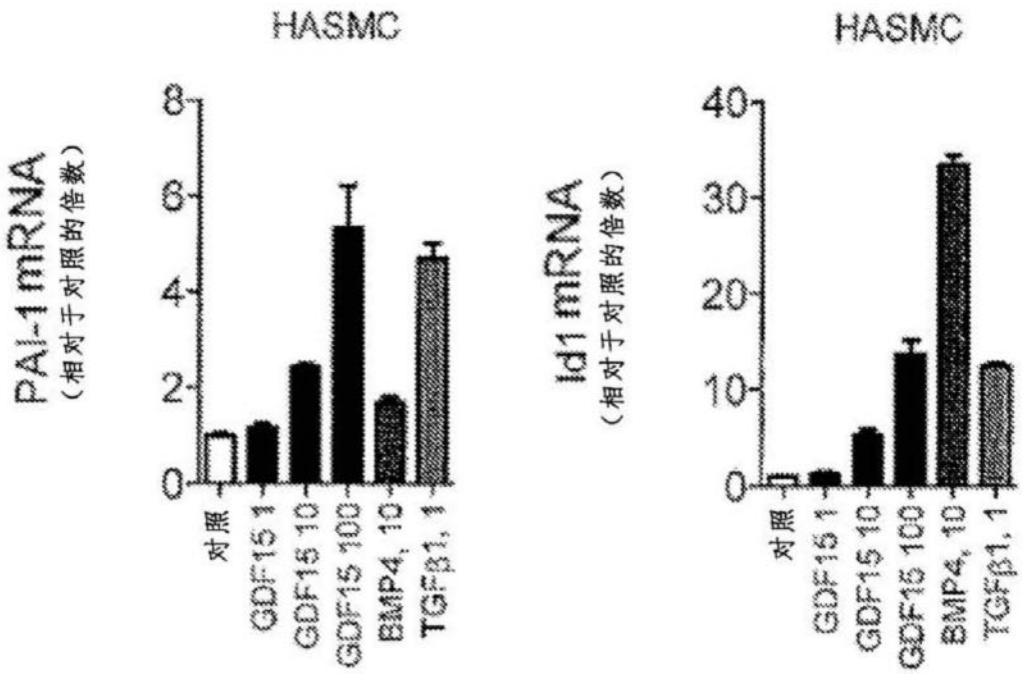

HASMC
PAI-1 mRNA
（相对于对照的倍数）
8
6
4
2
0
对照
GDF15 1
GDF15 10
GDF15 100
BMP4, 10
TGFβ1, 1
HASMC
Id1 mRNA
（相对于对照的倍数）
40
30
20
10
0
对照
GDF15 1
GDF15 10
GDF15 100
BMP4, 10
TGFβ1, 1

图7B

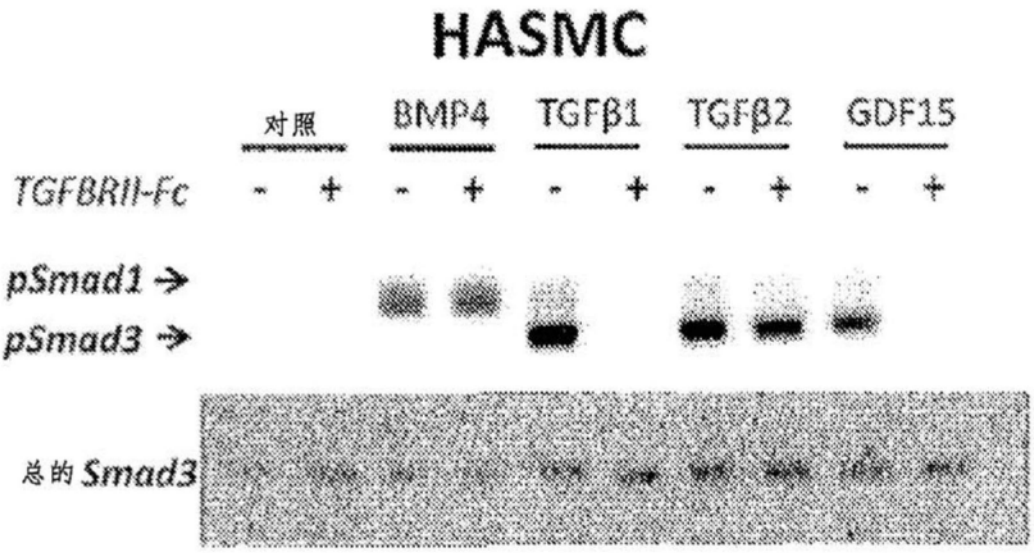

HASMC
对照
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
GDF15
TGFBRII-Fc
- + - + - + - + - +
pSmad1 →
pSmad3 →
总的 Smad3

图8A

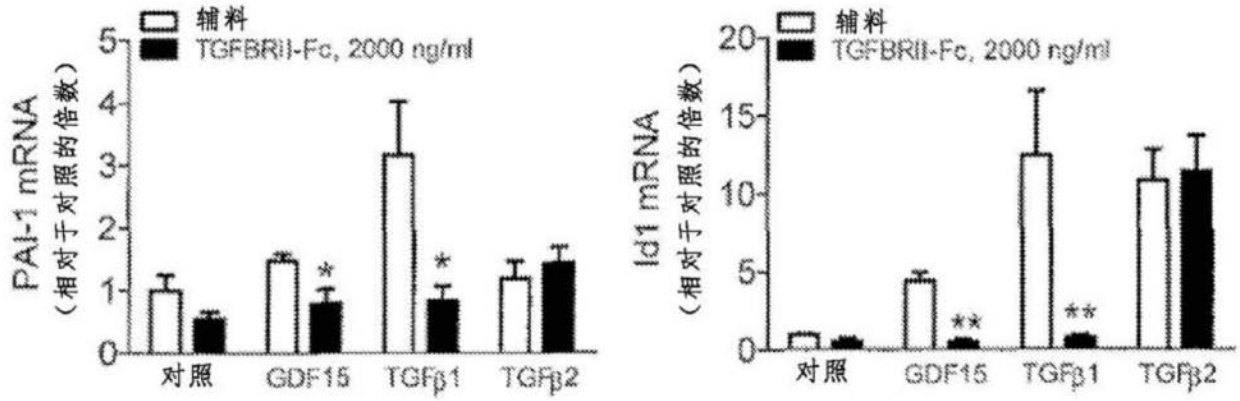

辅料
TGFBRII-Fc, 2000 ng/ml
PAI-1 mRNA
（相对于对照的倍数）
0
1
2
3
4
5
*
*
对照
GDF15
TGFβ1
TGFβ2
辅料
TGFBRII-Fc, 2000 ng/ml
Id1 mRNA
（相对于对照的倍数）
0
5
10
15
20
**
**
对照
GDF15
TGFβ1
TGFβ2

图8B

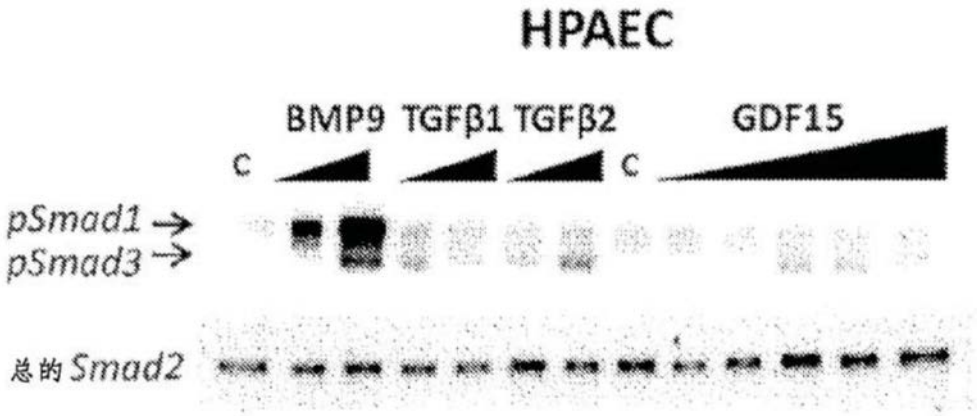

HPAEC
BMP9
TGFβ1
TGFβ2
GDF15
C
C
pSmad1
pSmad3
总的Smad2

图9

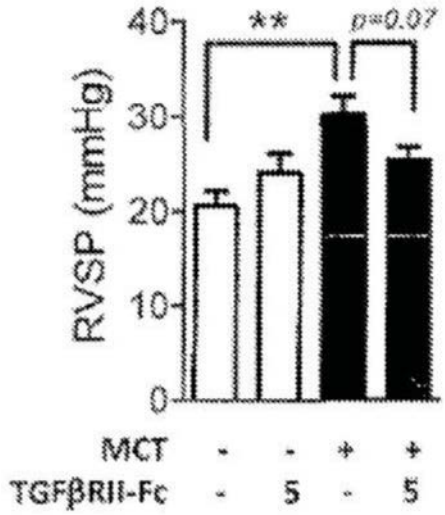

**
p=0.07
RVSP (mmHg)
0
10
20
30
40
MCT - - + +
TGFβRII-Fc - 5 - 5

图10A

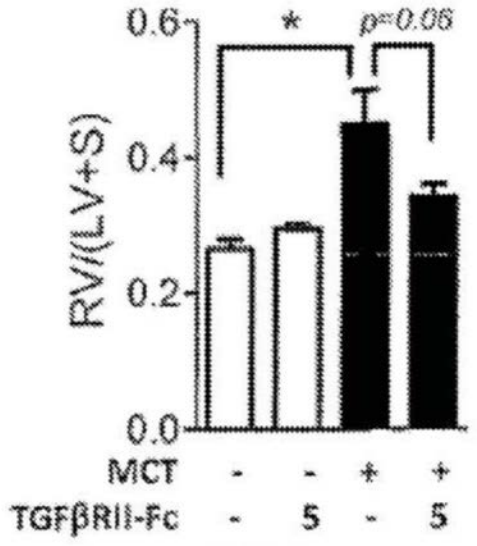

0.6
0.4
0.2
0.0
RVI/(LV+S)
*
p=0.06
MCT - - + +
TGFβRII-Fc - 5 - 5

图10B

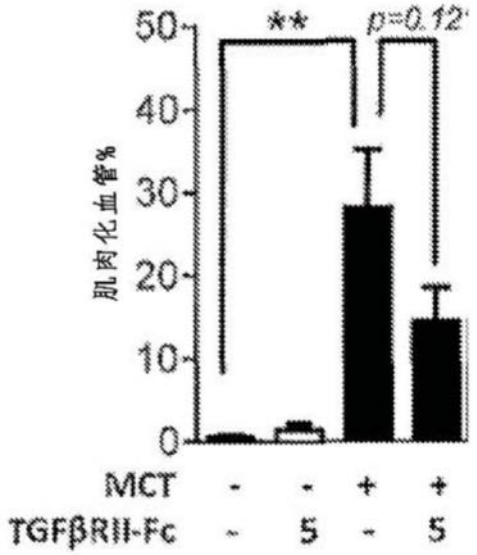

50
40
30
20
10
0
肌肉化血管%
**
p=0.12
MCT - - + +
TGFβRII-Fc - 5 - 5

图10C

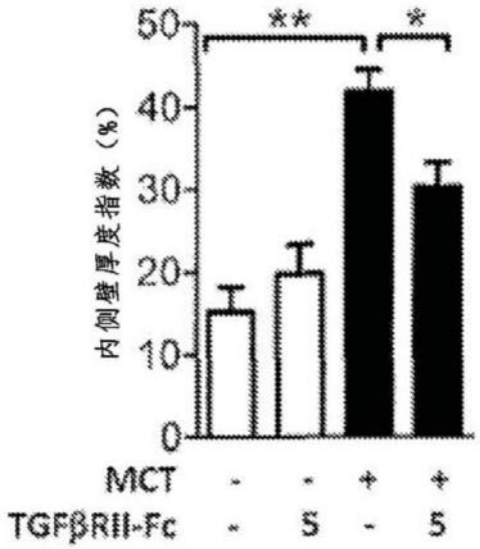

50
40
30
20
10
0
内侧壁厚度指数（%）
**
*
MCT - - + +
TGFβRII-Fc - 5 - 5

图10D

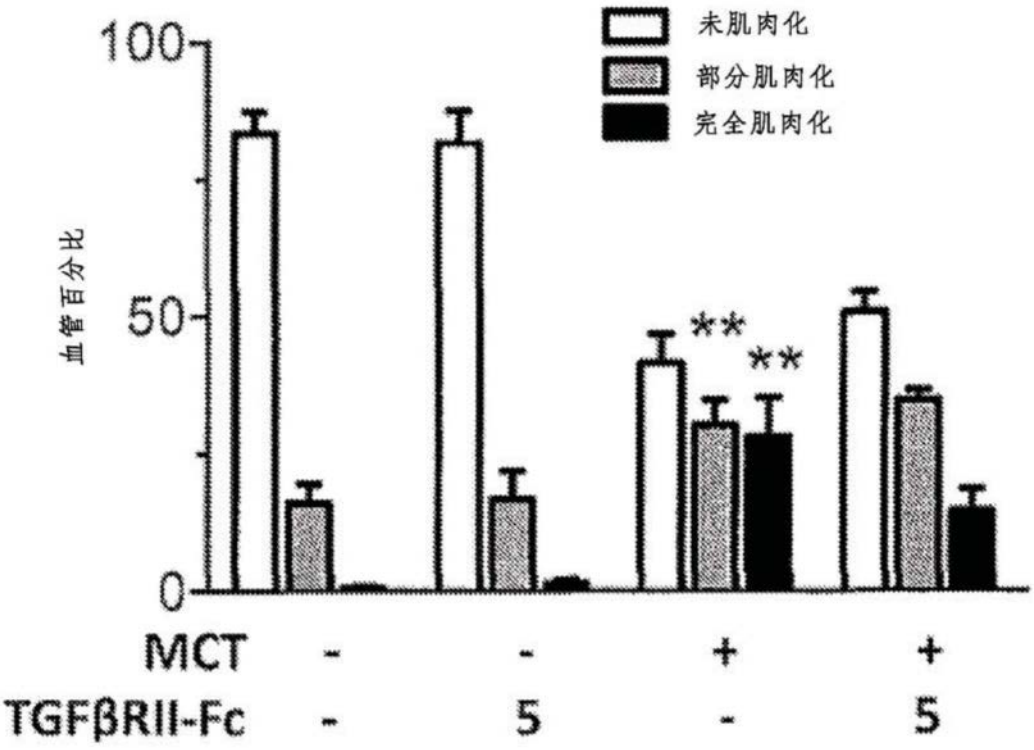

未肌肉化
部分肌肉化
完全肌肉化
100
50
0
血管百分比
**
**
MCT - - + +
TGFβRII-Fc - 5 - 5

图10E

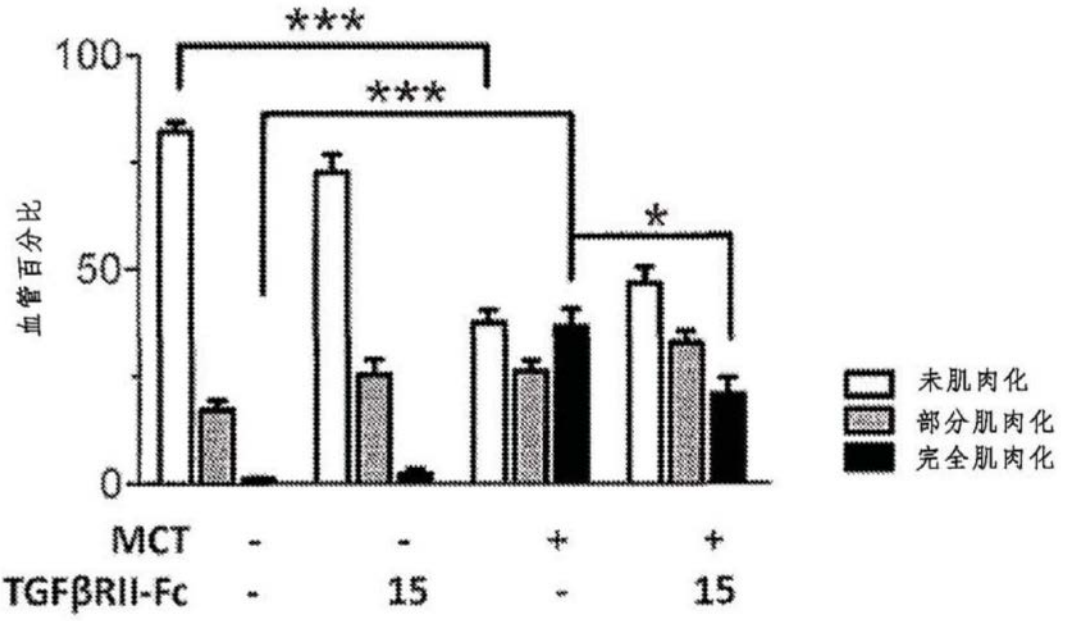


图11

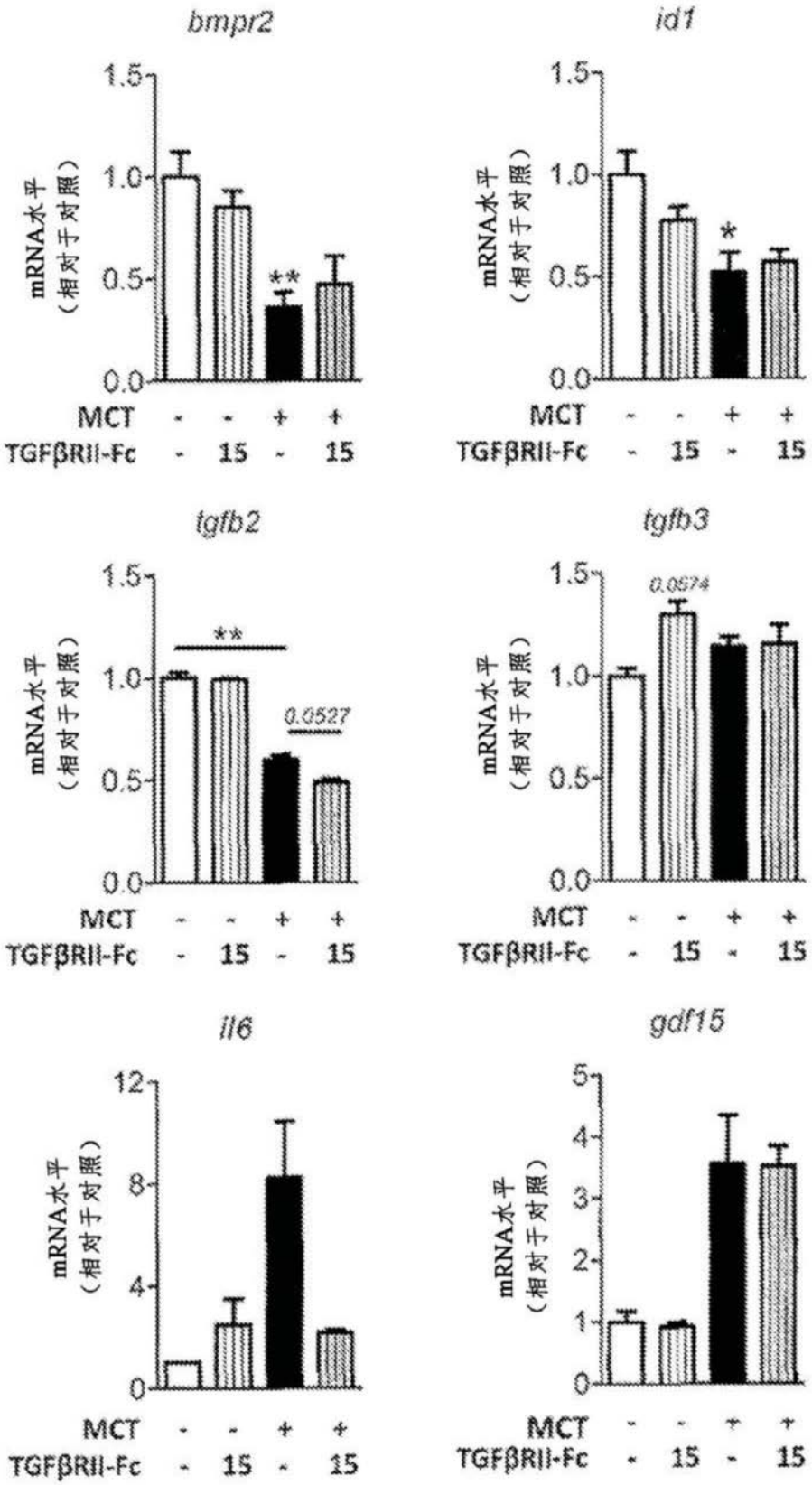

bmpr2
id1
tgfb2
tgfb3
il6
gdf15
mRNA水平
（相对于对照）
MCT
TGFβRII-Fc
**
*
0.0527
0.0574

图12

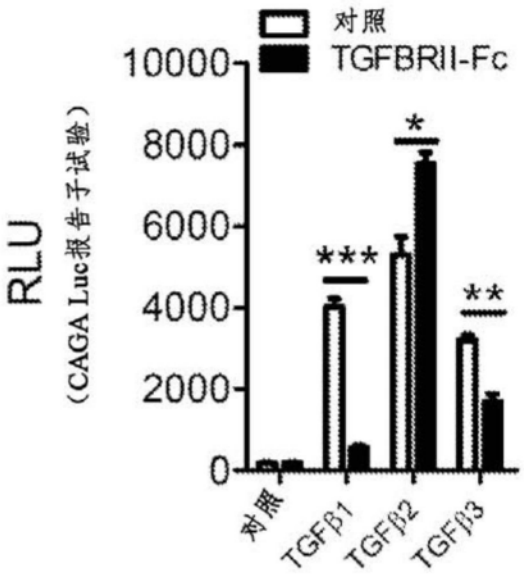

对照
TGFBRII-Fc
RLU
(CAGA Luc报告子试验)
10000
8000
6000
4000
2000
0
***
*
**
对照
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3

图13A

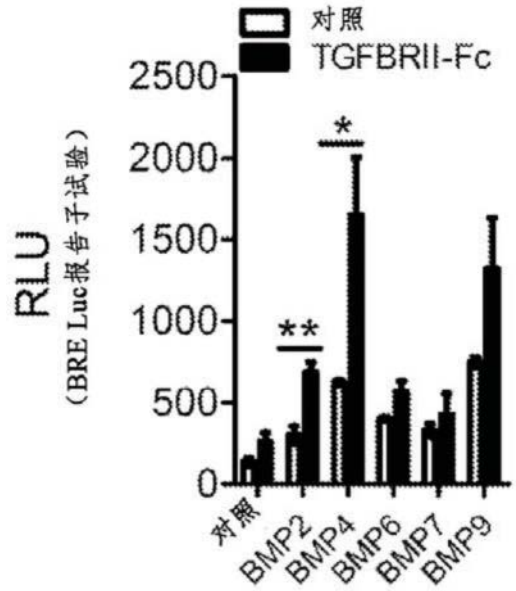

对照
TGFBRII-Fc
RLU
(BRE Luc报告子试验)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
*
对照
BMP2
BMP4
BMP6
BMP7
BMP9

图13B

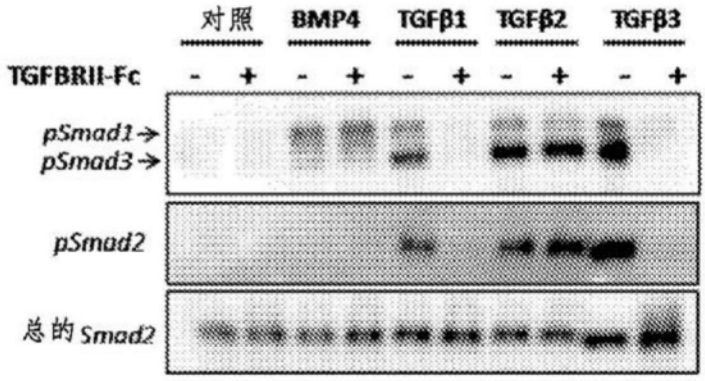

对照
BMP4
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3
TGFBRII-Fc
- + - + - + - + - +
pSmad1→
pSmad3→
pSmad2
总的 Smad2

图13C

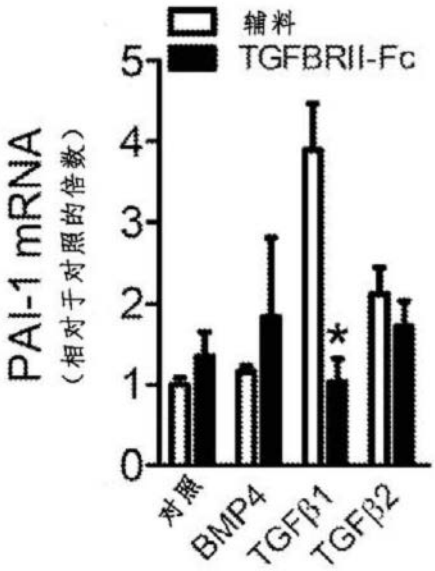

辅料
TGFBRII-Fc
PAI-1 mRNA
（相对于对照的倍数）
0
1
2
3
4
5
*
对照
BMP4
TGFβ1
TGFβ2

图13D

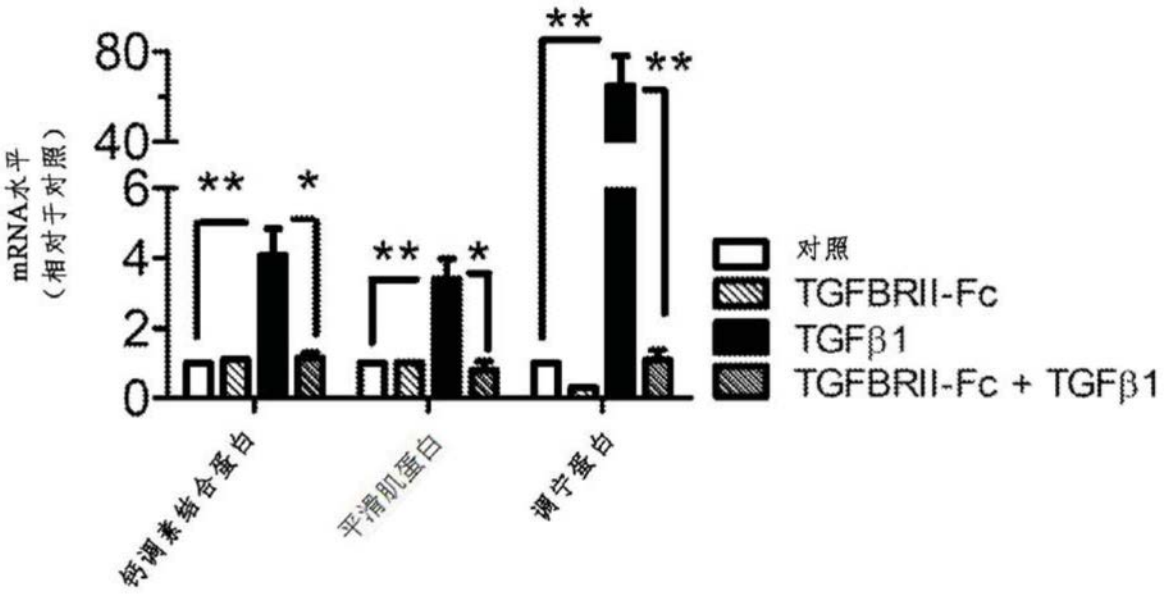

mRNA水平
（相对于对照）
80
40
6
4
2
0
**
*
**
*
**
**
对照
TGFBRII-Fc
TGFβ1
TGFBRII-Fc + TGFβ1
钙调素结合蛋白
平滑肌蛋白
调宁蛋白

图14

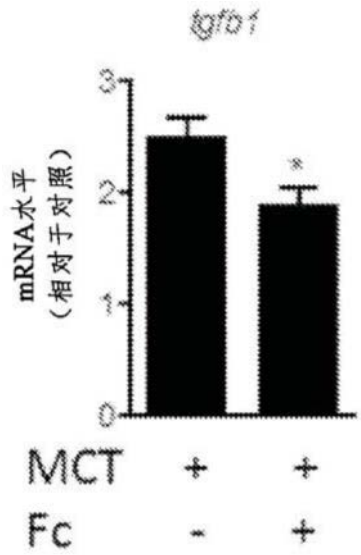

tgfb1
mRNA水平
（相对于对照）
3
2
1
0
*
MCT + +
Fc - +

图15A

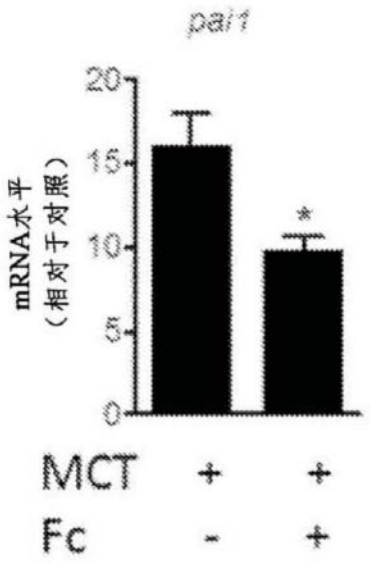

pai1
mRNA水平
（相对于对照）
20
15
10
5
0
*
MCT + +
Fc - +

图15B

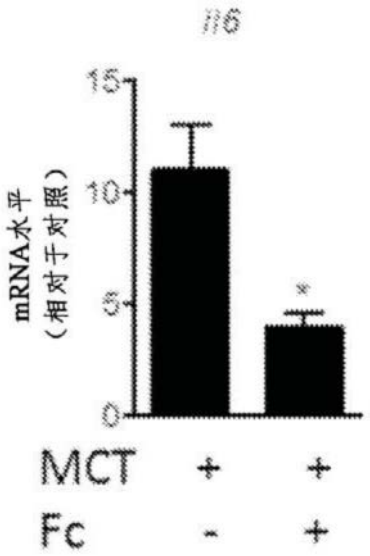

il6
mRNA水平
（相对于对照）
15
10
5
0
*
MCT + +
Fc - +

图15C

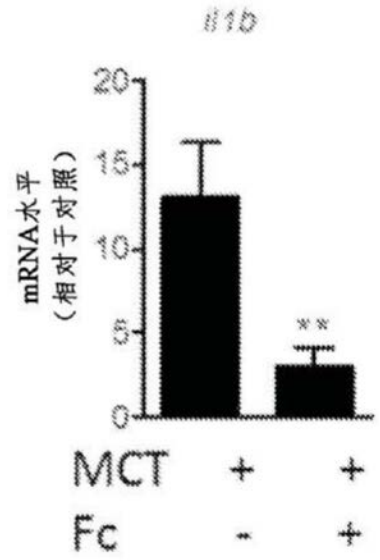

Il1b
mRNA水平
（相对于对照）
20
15
10
5
0
**
MCT + +
Fc - +

图15D

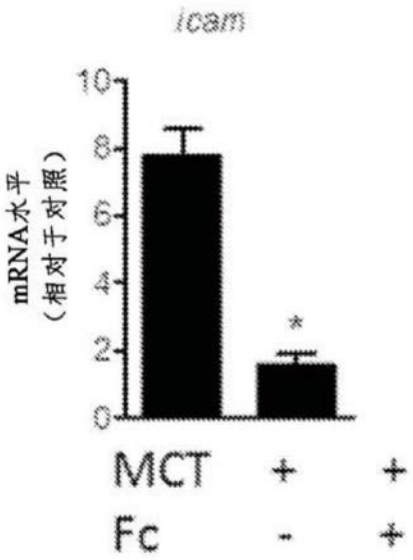

Icam
mRNA水平
（相对于对照）
10
8
6
4
2
0
*
MCT + +
Fc - +

图15E

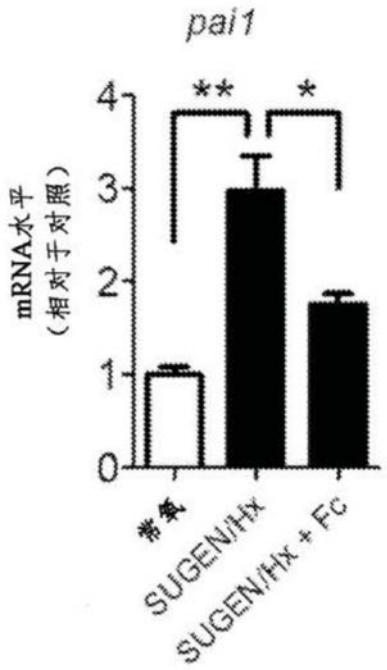

pai1
**
*
4
3
2
1
0
mRNA水平
（相对于对照）
常氧
SUGEN/Hx
SUGEN/Hx + Fc

图16A

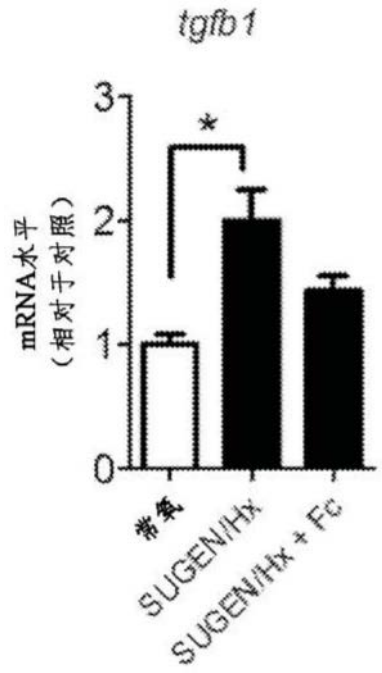

tgfb1
*
3
2
1
0
mRNA水平
（相对于对照）
常氧
SUGEN/Hx
SUGEN/Hx + Fc

图16B

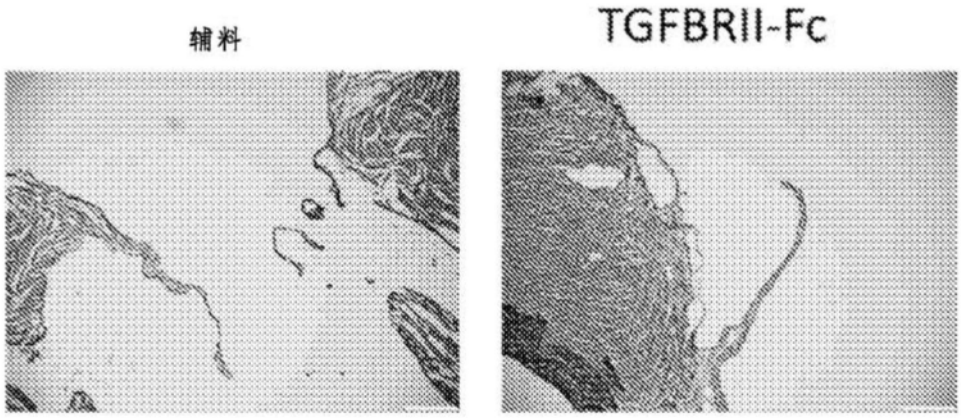


图17A

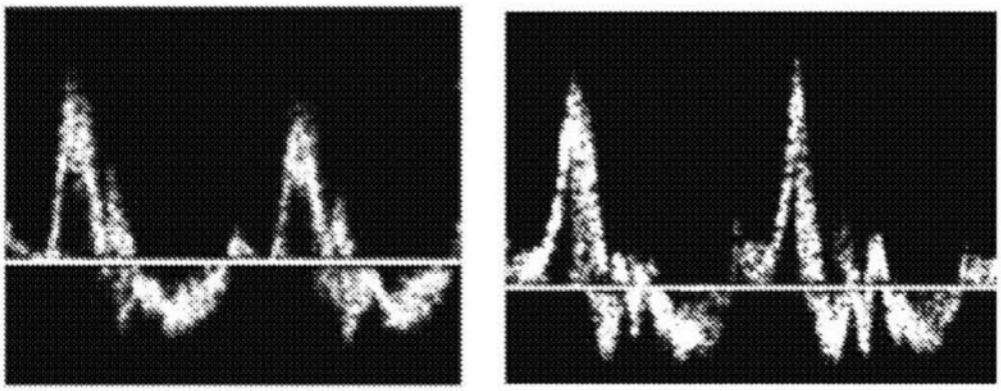


图17B

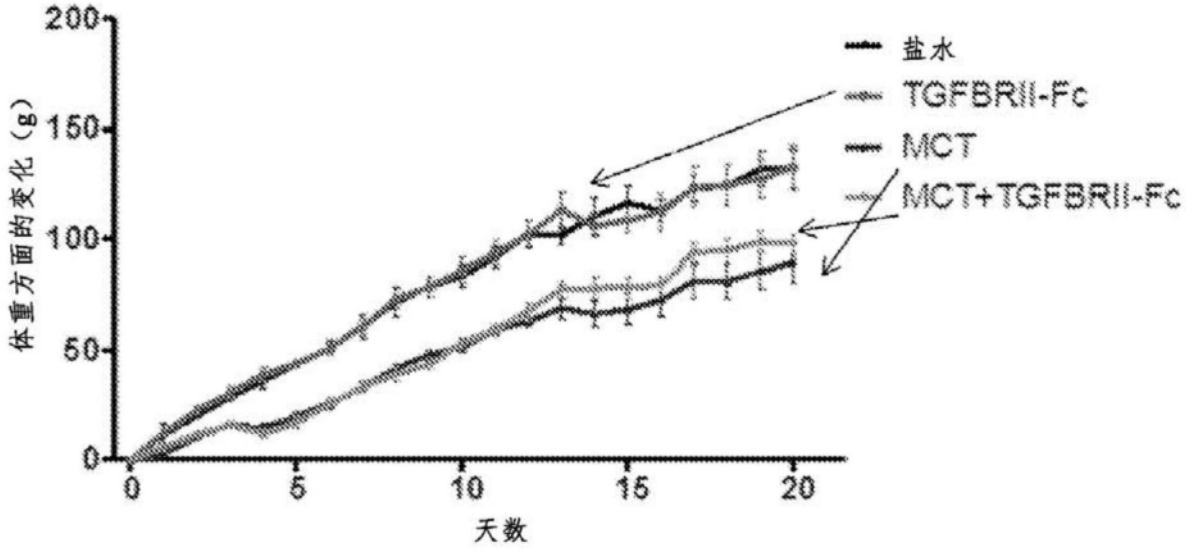


图18

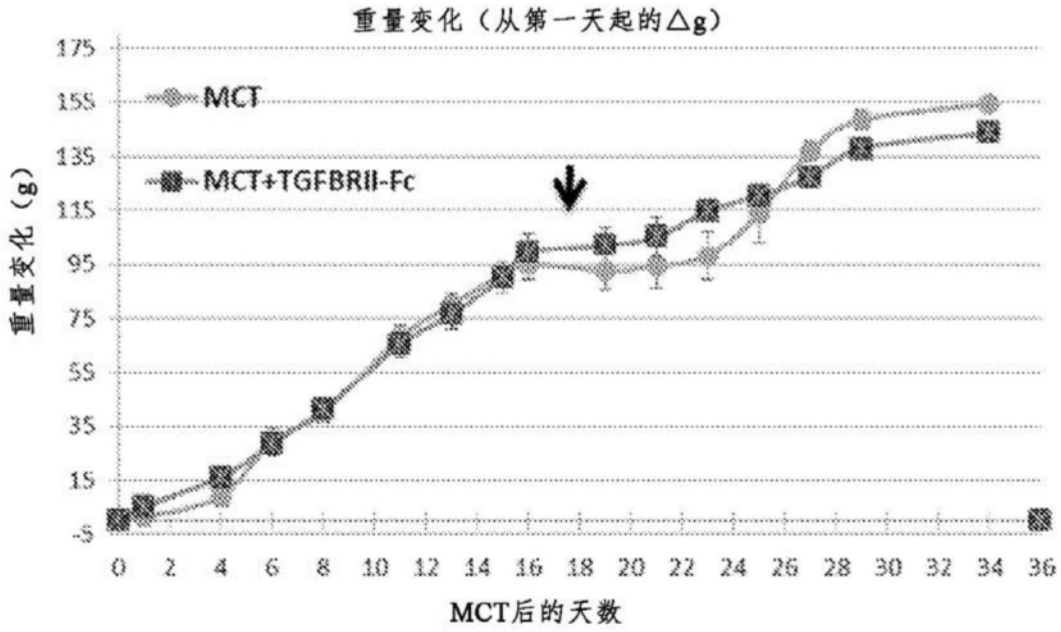

重量变化（从第一天起的△g）
MCT
MCT+TGFBRII-Fc
重量变化（g）
175
155
135
115
95
75
55
35
15
-5
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36
MCT后的天数

图19

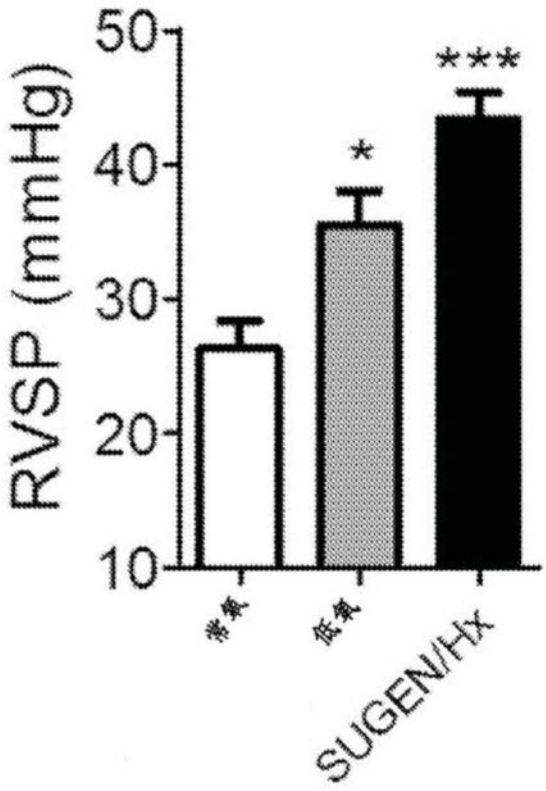

RVSP (mmHg)
50
40
30
20
10
*
***
常氧
低氧
SUGEN/HX

图20A

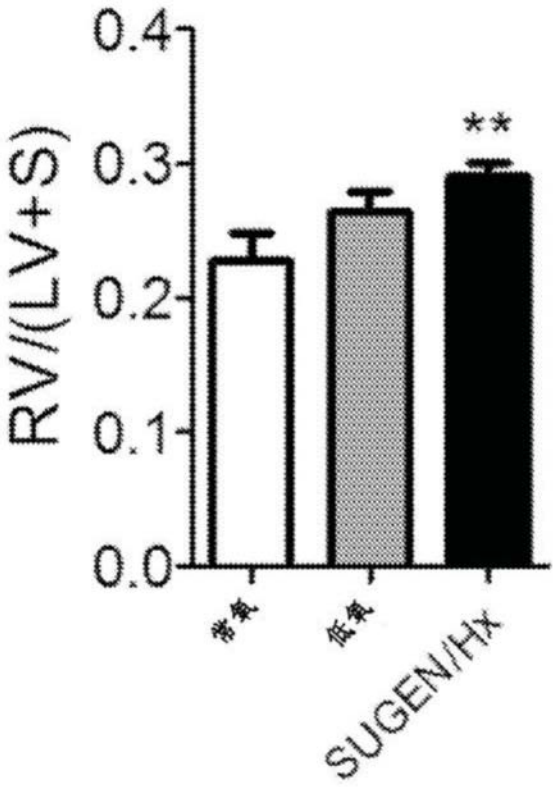


图20B