



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I586364 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：098114652

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/02 美國

61/050,168

2009/01/12 美國

61/144,131

(71)申請人：艾西利羅製藥公司(美國) ACCELERON PHARMA, INC. (US)

美國

路德維格學會癌症研究公司(瑞士) LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD. (CH)

美國

(72)發明人：格林堡艾斯亞 GRINBERG, ASYA (RU)；克諾夫約翰 KNOFF, JOHN (US)；古莫拉芬卓 KUMAR, RAVINDRA (US)；皮爾沙羅柏特 S PEARSA, ROBERT S. (US)；希拉傑思柏 SEEHRA, JASBIR (US)；皮拉斯克利思汀 PIETRAS, KRISTIAN (SE)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

(56)參考文獻：

US 2007065444A1

US 2009226441A1

David L., " Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells " Blood. 2007, 109(5), 1953-1961 摘要、第1956頁左欄第2段

Chantrain CF., " Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases " Eur J Cancer. 2006, 42(3), 310-318 全

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：18 共 118 頁

(54)名稱

調節血管新生與周圍細胞組成的方法與組合物

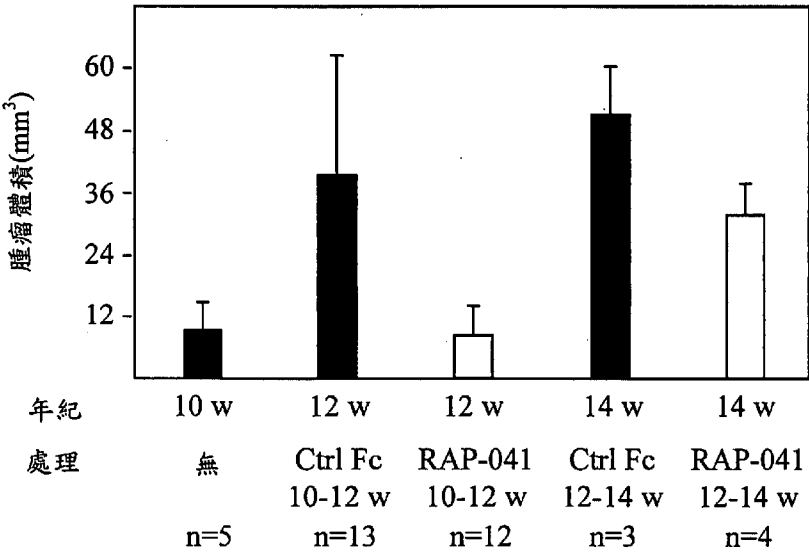
METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODULATING ANGIOGENESIS AND PERICYTE COMPOSITION

(57)摘要

某些態樣中，本揭露係關於深入理解包括類活化素激酶 I(ALK1)聚胜肽之細胞外區塊之配體-結合部分的聚胜肽，其可用來活體內抑制血管新生，特別係用於承受血管新生-相關之異常的哺乳類中。此外，本揭露顯示 ALK1 的抑制劑可用來提高血管化組織(包括腫瘤與視網膜)中周圍細胞覆蓋。本揭露亦確認 ALK1 的配體並顯示上述配體具有促血管新生活性，並描述抑制受體-配體交互作用的抗體。

In certain aspects, the present disclosure relates to the insight that a polypeptide comprising a ligand-binding portion of the extracellular domain of activin-like kinase I (ALK1) polypeptide may be used to inhibit angiogenesis in vivo, particularly in mammals suffering angiogenesis-related disorders. Additionally, the disclosure demonstrates that inhibitors of ALK1 may be used to increase pericyte coverage in vascularized tissues, including tumors and the retina. The disclosure also identifies ligands for ALK1 and demonstrates that such ligands have pro-angiogenic activity, and describes antibodies that inhibit receptor-ligand interaction

指定代表圖：



第 14 圖

公告本

第 98114652 號專利案 98 年 9 月修正

## 發明專利說明書

98 年 9 月 1 日 修正 補充 (本份)

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※ 申請案號：98114652

※ 申請日期：2009 年 5 月 1 日

※ IPC 分類：

## 一、發明名稱：(中文/英文)

調節血管新生與周圍細胞組成的方法與組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODULATING  
ANGIOGENESIS AND PERICYTE COMPOSITION

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00

(2006.01)

## 二、中文發明摘要：

某些態樣中，本揭露係關於深入理解包括類活化素激酶 I (ALK1) 聚胜肽之細胞外區塊之配體-結合部分的聚胜肽，其可用來活體內抑制血管新生，特別係用於承受血管新生-相關之異常的哺乳類中。此外，本揭露顯示 ALK1 的抑制劑可用來提高血管化組織(包括腫瘤與視網膜)中周圍細胞覆蓋。本揭露亦確認 ALK1 的配體並顯示上述配體具有促血管新生活性，並描述抑制受體-配體交互作用的抗體。

## 三、英文發明摘要：

In certain aspects, the present disclosure relates to the insight that a polypeptide comprising a ligand-binding portion of the extracellular domain of activin-like kinase I (ALK1) polypeptide may be used to inhibit angiogenesis in vivo, particularly in mammals suffering angiogenesis-related disorders. Additionally, the disclosure demonstrates that inhibitors of ALK1 may be used to increase pericyte coverage in vascularized tissues, including tumors and the retina. The disclosure also

identifies ligands for ALK1 and demonstrates that such ligands have pro-angiogenic activity, and describes antibodies that inhibit receptor-ligand interaction

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(14)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於調節血管新生與周圍細胞組成的方法與組合物。

### 【先前技術】

血管新生(形成新血管的過程)在許多正常與非正常生理狀況中係重要的。正常生理狀況下，人類與動物在特定且有限的情況下進行血管新生。例如，通常在傷口癒合、胚胎發育以及黃體、子宮內膜與胎盤形成中發現血管新生。

不欲或非適當調節的血管新生發生於許多異常中，其中異常內皮生長會造成或參與病理過程。例如，血管新生參與許多腫瘤的生長。已經知道失去調控的血管新生牽涉於病理過程中，諸如類風濕性關節炎、視網膜病變、血管瘤(hemangiomas)與牛皮癬。已經將存在有非受控制之血管新生的不同病理疾病狀態歸類成血管新生相關之疾病。

咸信受控制與非受控制之血管新生兩者以相似方式進行。微血管主要係由內皮細胞與周圍細胞(pericyte)組成，由基底膜所環繞。血管新生開始於內皮細胞與白血球釋出之酵素對基底膜的侵蝕。血管內腔之襯裡的內皮細胞接著突出穿過基底膜。血管新生因子引發內皮細胞

遷移穿過侵蝕之基底膜。遷移細胞形成自原本血管突出之「嫩芽」，其中內皮細胞進行有絲分裂與增殖。內皮嫩芽彼此融合而形成微血管圈，產生新血管。

已經證實抑制血管新生的試劑可有效治療多種異常。已經證實結合血管內皮生長因子(VEGF)之單株抗體 Avastin<sup>TM</sup> (貝伐單抗(bevacizumab))可有效治療多種癌症。已經證實結合 VEGF 之適體(aptamer)Macugen<sup>TM</sup> 可有效治療新血管性(濕)年齡相關之斑部退化。SDF/CXCR4 信號路徑的拮抗劑可抑制腫瘤新血管作用並有效地對抗小鼠模式中的癌症(Guleng 等人, Cancer Res. 2005 Jul 1; 65(13): 5864-71)。異香豆素 2-(8-羥-6-甲氧-1-側氧-1H-2-苯并呋喃-3-基)丙酸(NM-3)已經完成第 1 期臨床評估，其係口服生物可用之血管新生抑制劑。NM-3 在試管內直接殺死內皮與腫瘤細胞兩者，且係有效於治療不同的人類腫瘤異種移植之小鼠(Agata 等人, Cancer Chemother Pharmacol. 2005 Dec; 56(6): 610-4.)。已經顯示沙利竇邁(thalidomide)與相關化合物在癌症治療中的有利作用，且雖然作用的分子機制尚未明瞭，但血管新生的抑制似乎係抗-腫瘤作用的重要構成要素(參閱例如，Dredge 等人, Microvasc Res. 2005 Jan; 69(1-2): 56-63)。TNF- $\alpha$  拮抗劑在治療類風濕性關節炎中的成功部分係歸因於在紅腫關節組織上的抗血管新生作用(Feldmann 等人, Annu Rev Immunol. 2001; 19:

163-96)。廣泛地預期抗血管新生治療具有對其他炎性疾病(特別係牛皮癬)的有利作用。雖然許多抗血管新生劑具有在血管新生上的作用而不需理會影響之組織為何，但其他血管新生劑傾向具有組織選擇性作用。

周圍細胞係血管組織之一組成細胞類型，伴隨著內皮細胞與平滑肌細胞。周圍細胞對內皮細胞的比例在中央神經系統中最高，而咸信周圍細胞在血腦障壁中扮演重要的角色。糖尿病性視網膜病變以視網膜微血管中之周圍細胞損失著名，且咸信這種周圍細胞損失對疾病的進展具有重要的病生理作用。

樂見有額外的組合物與方法來抑制血管新生且提高血管化組織中的周圍細胞覆蓋。這些包括能抑制不欲之血管生長(不論是普遍性或是在某些組織與/或疾病狀態中)的方法與組合物。

### 【發明內容】

某種程度上，本揭露呈現類活化素激酶 I (ALK1)-介導之調控系統的特性描述以及此系統在活體內血管新生與調控血管化組織中周圍細胞覆蓋的角色。某些態樣中，本揭露提供 ALK-1 配體的拮抗劑以及上述拮抗劑作為抗血管新生劑或提高周圍細胞覆蓋的應用。此外，本揭露提供 ALK-1 本身的拮抗劑以及上述拮抗劑作為抗血管新生劑的應用。如本文所述，ALK1 係配體 GDF5 類(包括



GDF6 與 GDF7) 的受體，並亦為配體 BMP9 類(包括 BMP10) 的受體。本揭露顯示 ALK1 介導之信號傳遞與上述配體係牽涉於活體內血管新生作用中，且此調控系統的抑制具有有效的抗血管新生作用。此外，本揭露顯示 ALK1 調控系統的抑制造成提高血管化組織中之周圍細胞覆蓋。因此某些態樣中，本揭露提供 ALK1 調控系統的拮抗劑(包括受體或一或更多配體的拮抗劑)用於抑制血管新生。某些態樣中，本揭露提供 ALK1 配體的拮抗劑用於治療癌症，特別係多發性骨髓瘤、黑色素瘤、肺癌、胰臟癌(特別係胰臟內分泌組織的腫瘤)、乳癌(諸如，原發性乳癌或轉移性乳癌；動情素受體陽性(ER+)或動情素受體陰性(ER-))、類風濕性關節炎、眼睛中病理血管新生相關之異常以及血管化組織中周圍細胞損失相關之異常，例如糖尿病性視網膜病變。

某些態樣中，本揭露提供包括 ALK1 之細胞外區塊之配體結合部分的聚胜肽(「ALK1 ECD 聚胜肽」)用於抑制血管新生。雖然不希望受到任何特定作用機制的束縛，但預期上述聚胜肽藉由結合至 ALK1 之配體並抑制這些配體與 ALK1 以及其他受體交互作用的能力而作用。某些實施例中，ALK1 ECD 聚胜肽包含之胺基酸序列係至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同於序列編號：1 之人類 ALK1 序列的 22-118 胺基酸序列。ALK1 ECD 聚胜肽可應用成小單體蛋白或二聚化

形式(例如，表現成融合蛋白)，特別係用於局部施加至組織(例如，眼睛)。亦可將 ALK1 ECD 融合至第二聚胜肽部分以提供改良之特性，例如半生期提高或者生產或純化的較大便利。融合至免疫球蛋白之 Fc 部分或鍵結至聚氧乙烯部分(例如，聚乙二醇)可特別有用於提高 ALK1 ECD 聚胜肽在全身性施加(諸如，靜脈內、動脈內與腹膜內施加)的血清半生期。如本文所示，全身性施加之 ALK1-Fc 聚胜肽具有眼睛中之有效抗血管新生作用並亦提供類風濕性關節炎與多種腫瘤之鼠科模式中的正面作用。某些實施例中，ALK1-Fc 融合蛋白包括一聚胜肽的胺基酸序列係至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同於序列編號：1 之胺基酸序列 22-118，以間隔連接子或不以間隔連接子任一者方式將聚胜肽融合至免疫球蛋白之 Fc 部分，且其中 ALK1-Fc 融合蛋白以低於  $1 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  結合至 GDF5、GDF7 與 BMP9 且以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1。可選擇與有機體相稱的 Fc 部分。Fc 部分選擇性地係人類 IgG1 的 Fc 部分。較佳實施例中，ALK1-Fc 融合蛋白包括序列編號：1 之胺基酸 22-118。ALK1-Fc 融合蛋白選擇性地包括序列編號：3 之胺基酸序列。ALK1-Fc 融合蛋白係選擇性地藉由在哺乳類細胞株(特別係中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株)中表現序列編號：4 之核酸產生的蛋白。可將 ALK1-ECD 聚胜肽配置成實質無熱源(pyrogen free)藥學配製物。可將藥學配製物配置用於全身性施加(諸

如，靜脈內、動脈內或皮下輸送)或局部施加(例如，至眼睛)。

某些態樣中，本揭露確定發展用於治療背景之 ALK1-Fc 融合蛋白的相當同質性製備物的難題。如本文所述，ALK1-Fc 融合蛋白傾向聚集成較高階的多聚體。本揭露提供針對這些難題的解決方法並因此提供包括 ALK1-Fc 融合蛋白之藥學製備物，其中上述製備物係至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%由二聚體式 ALK1-Fc 融合蛋白所構成。因此某些態樣中，本揭露提供包括 ALK1-Fc 融合蛋白之藥學製備物，ALK1-Fc 融合蛋白包括：胺基酸序列係至少 97%相同於序列編號：1 之胺基酸序列 22-118 的聚胜肽，聚胜肽係融合至免疫球蛋白之 Fc 部分，且其中 ALK1-Fc 融合蛋白以低於  $1 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  結合至 GDF5、GDF7 與 BMP9 並以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1，且其中至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的 ALK1-Fc 融合蛋白係以二聚體形式存在。ALK1-Fc 融合蛋白之 Fc 部分可為人類 IgG1 之 Fc 部分。ALK1-Fc 融合蛋白可包括序列編號：3 之胺基酸序列。藉由在哺乳類細胞株(特別係中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株)中表現序列編號：4 之核酸產生 ALK1-Fc 融合蛋白。可將上述藥學製備物配置成適合施加至眼睛，特別係藉由注射。揭露之藥學製備物可用於多種本文所述之治療目的，包括抑制血管新生、治療腫瘤、治療類風濕

性關節炎、治療血管新生相關之眼睛異常及治療血管化組織中周圍細胞覆蓋損失相關之異常(例如，糖尿病性視網膜病變)。可搭配抑制血管新生的第二藥劑(例如，VEGF 拮抗劑(諸如，Avastin<sup>TM</sup>、索拉非尼(sorafenib)與 VEGF 受體陷阱)來應用 ALK1-Fc 藥學製備物。

本揭露顯示 ALK1 信號路徑的拮抗劑提高血管化組織中之周圍細胞覆蓋。因此，本揭露提供促進提高哺乳類血管化組織中之周圍細胞覆蓋的方法。上述拮抗劑可為任何本文所述之拮抗劑，包括 ALK1 ECD 蛋白(例如，ALK1-Fc)、DAN 蛋白以及指向 ALK1 與任何其之配體(包括 BMP9、BMP10、GDF5、GDF6 與 GDF7)的抗體。某些態樣中，本揭露提供促進提高有需要之哺乳類血管化組織中之周圍細胞覆蓋的方法，該方法包括對哺乳類施加有效劑量的 ALK1 ECD 蛋白。ALK1 ECD 蛋白可為 ALK1-Fc 融合蛋白，而 ALK1-Fc 融合蛋白包括之一聚胜肽的胺基酸序列係至少 90%相同於序列編號：1 之胺基酸序列 22-118，聚胜肽係融合至免疫球蛋白之 Fc 部分，且其中 ALK1-Fc 融合蛋白以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1。ALK1 ECD 蛋白可結合至一或更多選自下列所構成之群組的 ALK1 配體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。ALK1 ECD 聚胜肽包括之胺基酸序列係至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同於對應序列編號：1 之胺基酸 34-95 的胺基酸序列。ALK1 ECD 可

包括在嚴格雜合條件下與序列編號：2 之核苷酸 100-285(或編碼相同胺基酸序列的序列編號：2 之核苷酸 100-285 變體)雜合之核酸所編碼的胺基酸序列。ALK1-Fc 融合蛋白可具有序列編號：3 之序列。可靜脈內或局部地輸送 ALK1 ECD 融合蛋白至眼睛。某些態樣中，本揭露提供促進提高有需要之哺乳類血管化組織中之周圍細胞覆蓋的方法，該方法包括對哺乳類施加有效劑量的抗體，其結合至序列編號：1 之胺基酸 22-118 所構成之 ALK1 聚胜肽並抑制至少一選自下列所構成之群組之 ALK1 配體的結合：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。抗體以低於  $5 \times 10^{-8}$  M、低於  $1 \times 10^{-9}$  M 或低於  $1 \times 10^{-10}$  M 的  $K_D$  結合至 ALK1 聚胜肽。抗體可抑制 ALK1 對 ALK1 配體的結合，其中 ALK1 配體係選自下列所構成之群組：BMP9 與 BMP10。可靜脈內或眼睛內地施加抗體。WO 2007/040912 中描述之抗體可用於上述方法中。可以與抑制血管新生的第二試劑(例如，VEGF 拮抗劑)一起施加 ALK1 信號拮抗劑。欲治療之哺乳類可具有糖尿病性視網膜病變或其他視網膜異常(特徵係視網膜血管組織中之周圍細胞覆蓋的損失)或選自下列所構成之群組的腫瘤：黑色素瘤、肺腫瘤、多發性骨髓瘤、胰臟腫瘤(例如，胰臟內分泌組織的腫瘤)、乳癌(諸如，原發性乳癌或轉移性乳癌；動情素受體陽性(ER+)或動情素受體陰性(ER-))。

某些態樣中，本揭露提供抑制哺乳類之血管新生的方法，其藉由施加任何本文普遍或特定描述之 ALK1 ECD 聚胜肽。一實施例中，方法包括對哺乳類施加有效劑量的 ALK1-Fc 融合蛋白，其中 ALK1 Fc 融合蛋白包括之一聚胜肽的胺基酸序列係至少 90%相同於序列編號：1 之胺基酸序列 22-118，聚胜肽係融合至免疫球蛋白的 Fc 部分，且其中 ALK1-Fc 融合蛋白以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1。ALK1-Fc 融合蛋白選擇性地結合至一或更多選自下列所構成之群組的 ALK1 配體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。ALK1-Fc 融合蛋白選擇性地具有序列編號：3 之序列。可局部地(例如，至眼睛)或全身性地(諸如，靜脈內、動脈內或皮下)施加 ALK1 ECD 聚胜肽。特定實施例中，本揭露提供抑制哺乳類眼睛之血管新生的方法，其藉由在一遠離眼睛的位置施加 ALK1-Fc 蛋白至哺乳類，例如全身性施加。

某些態樣中，本揭露提供結合至 ALK1(特別係位於細胞外區塊、序列編號：1 之胺基酸 22-118 中的表位)並抑制 ALK1 對至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體之結合的抗體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。根據這些配體對 ALK1 的親合力，抗體可以低於  $5 \times 10^{-8}$  M 且選擇性介於  $5 \times 10^{-8}$  與  $1 \times 10^{-10}$  間之  $K_D$  結合。預期親合力在此範圍間之抗體可抑制一或更多 GDF5、6 與 7 的信號，但對 BMP9 與 10 的信號具有較少的作用。上述

抗體較佳地抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體所引發的血管新生：GDF5、GDF6 與 GDF7。雖然不希望受到特定機制的束縛，但預期上述抗體將直接地抑制 ALK1 活性，這應與 ALK1-Fc 融合蛋白(預期可抑制 ALK1 配體之活性)之活性相反。並不預期抗-ALK1 抗體干擾 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 或 BMP10 透過替代受體系統(諸如，BMPRIa、BMPRIb 與 BMPRII 複合體)的信號傳遞能力。然而，預期抗-ALK1 抗體會干擾 ALK1 低親合力配體(例如，TGF- $\beta$ ，其通常歸類成透過 ALK-1 觸發明顯信號事件，即便結合係相當弱)透過 ALK1 傳遞信號的能力，即便 ALK1 ECD 可能不結合或抑制上述低親合力配體。抗體可以低於  $1 \times 10^{-10}$  M 的  $K_D$  結合 ALK1 聚胜肽。將預期親合力位於此範圍內的抗體可抑制經由 BMP9 或 10 的信號傳遞。上述抗體較佳地抑制 BMP9 與 BMP10 對 ALK1 的結合。尤其，根據本文所揭露之數據，結合 ALK1 相當差的抗體可抑制 TGF $\beta$  結合至 ALK1 但卻無法抑制結合較緊的配體(諸如，GDF5 或 BMP9)。本文所述之抗體較佳係重組抗體，意謂已經利用分子生物技術構築之核酸表現的抗體，諸如單鏈抗體發展而來的人類化抗體或完全人類抗體。Fv、Fab 與單鏈抗體亦包括於詞彙「重組抗體」中。抗體亦可為多株或非重組性單株抗體(包括人類或鼠科類型以及取自基因轉殖小鼠之人類抗體)。可將抗體與 ALK1-ECD 聚胜肽配置成實質無熱源的藥學製備物。可將藥學製備物配置用於全身性施

加(諸如，靜脈內、動脈內或皮下輸送)或局部施加(例如，至眼睛)。WO 2007/040912 中描述之抗體可用於本文所述之多種方法中。

某些態樣中，本揭露提供抑制哺乳類之血管新生的方法，其藉由對哺乳類施加有效劑量的本文普遍或特定描述之抗體(結合至 ALK1 聚胜肽)。用於此目的之抗體可結合至 ALK1 之細胞外區塊(例如，結合至序列編號：1 之胺基酸 22-118 所構成之聚胜肽)或 ALK1 的另一部分。抗體可結合至序列編號：1 之胺基酸 22-118 所構成的聚胜肽並抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體之結合：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。抗體可以低於  $5 \times 10^{-8}$  M 與選擇性  $5 \times 10^{-8}$  與  $1 \times 10^{-10}$  之間的  $K_D$  結合至 ALK1 聚胜肽。抗體可抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體所刺激的血管新生：GDF5、GDF6 與 GDF7。選擇性抑制 GDF5、6 或 7 所介導之信號傳遞(相對於 BMP9 或 10 所介導之信號傳遞)的抗體可用來作為發生在 GDF5、6 或 7 所在組織(主要係骨頭或關節)中之血管新生的選擇性抑制劑。抗體可以低於  $1 \times 10^{-10}$  M 的  $K_D$  結合至 ALK1 聚胜肽。抗體可抑制 ALK1 對 ALK1 配體的結合，其中 ALK1 配體係選自下列所構成之群組：BMP9 與 BMP10。可局部地(例如，至眼睛)或全身性地(諸如，靜脈內、動脈內或皮下)施加抗-ALK1 抗體。特定實施例中，本揭露提供抑制哺乳類眼睛之血



管新生的方法，其藉由施加抗-ALK1 抗體。另一特定實施例中，本揭露提供治療具有多發性骨髓瘤之患者的方法。特定實施例中，本揭露提供在因為多個促血管新生因子(諸如，VEGF、PDGF 與/或 FGF)之病理血管新生異常中抑制血管新生的方法。

某些態樣中，本揭露提供結合本文揭露之 ALK1 配體並抑制 ALK1 配體對 ALK1 之結合的抗體。雖然不希望受到任何特定機制的束縛，但預期結合 ALK1 配體之抗體將具有性質類似 ALK1 ECD 聚胜肽的作用，因為兩種類型的試劑結合至配體而不是受體本身。某些實施例中，抗體結合至選自 GDF5、GDF6、GDF7 所構成之群組的配體。抗體可以低於  $5 \times 10^{-8}$  M 的  $K_D$  結合至 ALK1 配體。可針對抑制 ALK1 配體促進之血管新生來選擇抗體。CAM 試驗係選擇所欲抗體的適當試驗系統。上述抗體較佳係重組抗體，且可配置成實質無熱源的藥學製備物。可將藥學製備物配置用於全身性施加(諸如，靜脈內、動脈內或皮下輸送)或局部施加(例如，至眼睛)。

某些態樣中，本揭露提供結合至 ALK1 配體且抑制 ALK1 配體對 ALK1 之結合的抗體，其中 ALK1 配體係選自 BMP9 與 BMP10 所構成之群組。抗體可以低於  $1 \times 10^{-10}$  M 的  $K_D$  結合至 ALK1 配體。上述抗體較佳係重組抗體，且可配置成實質無熱源的藥學製備物。可將藥學製備物

配置用於全身性施加(諸如，靜脈內、動脈內或皮下輸送)或局部施加(例如，至眼睛)。

某些態樣中，本揭露提供抑制哺乳類之血管新生的方法，該方法包括對哺乳類施加有效劑量的抗體，該抗體結合至 ALK1 配體且抑制 ALK1 配體對 ALK1 的結合，其中 ALK1 配體係選自 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10 所構成之群組。抗體可抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體所刺激之血管新生：GDF5、GDF6 與 GDF7。

BMP/GDF 家族的成員(包括 BMP9、BMP10、GDF5、GDF6 與 GDF7)結合至第 I 型與第 II 型受體以形成功能性信號複合體。這些受體的結合位置係不同的。因此，某些實施例中，結合至 ALK1 配體且抑制配體對 ALK1 結合之抗體係在第 I 型受體之配體結合位置處或附近結合之抗體。

某些態樣中，本揭露提供抑制哺乳類之血管新生的方法，其藉由施加本文揭露之 ALK1 信號傳遞系統的其他抑制劑。上述抑制劑可包括減少 ALK1、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 或 BMP10 之生產的核酸(諸如，反義(antisense)或 RNAi 構築體)。亦可應用多種親合性結合試劑，諸如適體、隨機胜肽、蛋白支架，其經修飾而可結合至選擇之目標(上述支架的實例包括 anticalins 與 FNIII 區塊)；各個實例中，可針對破壞本文所述之 ALK1

調控系統的能力來選擇親合性結合試劑，藉由破壞 ALK1-配體交互作用或藉由抑制結合後發生之信號傳遞任一者。

進一步實施例中，本揭露描述 DAN 作為 ALK1 調控系統之調節者的角色。如本文所示，DAN 結合至 GDF5 類的配體但無法結合至 BMP9 類的配體。因此，預期 DAN 可抑制 GDF5、GDF6 或 GDF7 介導之血管新生但無法抑制 BMP9 或 BMP10 介導之血管新生。因此，DAN 可應用成抑制骨頭或關節(其中主要表現 GDF5 類的蛋白)中血管新生的選擇性試劑。因此某些實施例中，本揭露提供在骨頭或關節血管新生背景(包括類風濕性關節炎以及牽涉骨頭或關節之癌症(諸如，多發性骨髓瘤與骨頭轉移))應用成抗血管新生試劑之 DAN 蛋白。DAN 蛋白通常結合至一或更多選自下列所構成之群組的 ALK1 配體：GDF5、GDF6 與 GDF7，但對 BMP9 或 BMP10 的結合相當差。DAN 蛋白包括之一胺基酸序列係至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同於對應序列編號：10 之胺基酸 17-180 (成熟的人類 DAN) 或對應序列編號：10 之胺基酸 21-125 (DAN 的保留性半胱胺酸結區塊) 之胺基酸序列。DAN 蛋白亦可由一核酸所編碼，該核酸序列之互補在嚴格雜合條件下雜合至序列編號：11 之核苷酸 153-467 或具有相同編碼序列之序列編號：11 之核苷酸 153-467 變體 (「靜默」變體，例如在三聯

密碼之搖擺位置處包含一或更多改變)、或雜合至序列編號：11之核苷酸93-635或其之靜默變體。某些態樣中，DAN蛋白係融合蛋白，例如Fc融合蛋白。雖然預期DAN特別有用於抑制骨頭與關節(包括位於骨頭或關節中之腫瘤，諸如多發性骨髓瘤與骨頭轉移)中之血管新生，但其亦可用於其他背景中，例如位於別處之腫瘤或眼睛中。

某些態樣中，本揭露提供治療哺乳類之類風濕性關節炎的方法，該方法包括對具有類風濕性關節炎之哺乳類施加有效劑量之選自下列所構成之群組的試劑：ALK1 ECD蛋白；結合至ALK1配體且抑制ALK1配體對ALK1之結合的抗體，其中ALK1配體係選自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9與BMP10所構成之群組；結合至序列編號：1之胺基酸22-118所構成的ALK1聚胜肽且抑制至少一選自下列所構成之群組的ALK1配體之結合的抗體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9與BMP10；及DAN聚胜肽。

某些態樣中，本揭露提供治療哺乳類之腫瘤的方法。上述方法可包括對具有腫瘤之哺乳類施加有效劑量之選自下列所構成之群組的試劑：ALK1 ECD蛋白(例如，ALK1-Fc)；結合至ALK1配體且抑制ALK1配體對ALK1之結合的抗體，其中ALK1配體係選自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9與BMP10所構成之群組；結合至序列編號：1之胺基酸22-118所構成的ALK1聚胜肽且抑制至

少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體之結合的抗體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10；及 DAN 聚胜肽。方法可進一步包括施加抑制血管新生之第二試劑。腫瘤可以為骨頭相關之腫瘤，諸如白血病、骨髓腫瘤、多發性骨髓瘤或骨頭轉移(例如，通常伴隨乳癌或前列腺癌之那些骨頭轉移)。腫瘤可以係黑色素瘤、肺癌腫瘤、胰臟腫瘤(例如，胰臟內分泌組織之腫瘤)、或乳癌(諸如，原發性乳癌或轉移性乳癌)。乳癌可以係動情素受體陽性(ER+)或動情素受體陰性(ER-)。腫瘤亦可為應用多個促血管新生因子之腫瘤，例如對抗-VEGF 治療有抗性之腫瘤。

某些態樣中，本揭露提供眼用配方。上述配方可包括選自下列所構成之群組的試劑：ALK1 ECD 蛋白；結合至 ALK1 配體且抑制 ALK1 配體對 ALK1 之結合的抗體，其中 ALK1 配體係選自 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10 所構成之群組；結合至序列編號：1 之胺基酸 22-118 所構成的 ALK1 聚胜肽且抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體之結合的抗體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10；及 DAN 聚胜肽。

某些態樣中，本揭露提供治療眼睛之血管新生相關疾病的方法。上述方法包括全身性施加或對眼睛施加藥學配方，其包括有效劑量之選自下列所構成之群組的試劑：ALK1 ECD 蛋白；結合至 ALK1 配體且抑制 ALK1

配體對 ALK1 之結合的抗體，其中 ALK1 配體係選自 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10 所構成之群組；結合至序列編號：1 之胺基酸 22-118 所構成的 ALK1 聚胜肽且抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體之結合的抗體：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10；及 DAN 聚胜肽。

各個實例中，本文描述之試劑可搭配抑制血管新生之第二試劑加以施加。在欲抑制腫瘤之血管新生的位置處，可搭配具有抗-癌症作用之第二試劑(諸如，化學治療劑或生物抗-癌症劑)施加該試劑。

本揭露亦提供包括 ALK1-Fc 融合蛋白之眼用藥學配方，ALK1-Fc 融合蛋白的一胺基酸序列係至少 97%、98% 或 99% 相同於序列編號：1 之胺基酸序列 22-118，聚胜肽係融合至免疫球蛋白之 Fc 部分，且其中 ALK1-Fc 融合蛋白以低於  $1 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  結合至 GDF5、GDF7 與 BMP9 並以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1。一實施例中，融合蛋白具有序列編號：3 之序列。一實施例中，Fc 部分係來自人類 IgG1。一實施例中，融合蛋白係藉由在哺乳類細胞株中表現序列編號：4 之核酸所產生。一實施例中，細胞株係中國倉鼠卵巢細胞株。配方可進一步包括一或更多下列藥劑：培加尼布(pegaptanib)、雷珠單抗(ranibizumab)或糖皮質素(glucocorticoid)。一實施例中，配方係實質無熱源。

申請案亦提供包括一抗體之眼用藥學配方，抗體結合至序列編號：1之胺基酸22-118所構成之ALK1聚胜肽且抑制至少一選自下列所構成之群組的ALK1配體之結合：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9與BMP10。一實施例中，抗體抑制至少一選自下列所構成之群組的ALK1配體所刺激之血管新生：GDF5、GDF6與GDF7。一實施例中，抗體以低於 $5 \times 10^{-8}$  M的 $K_D$ 結合至ALK1聚胜肽。另一實施例中，抗體以低於 $1 \times 10^{-10}$  M的 $K_D$ 結合至ALK1聚胜肽。一實施例中，抗體抑制GDF5、GDF6、GDF7、BMP9或BMP10所刺激之血管新生。配方可進一步包括一或更多下列藥劑：培加尼布、雷珠單抗或醣皮質素。一實施例中，配方係實質無熱源。

某些態樣中，本揭露提供包括一抗體之眼用藥學配方，抗體結合至本文所揭露之ALK1配體且抑制ALK1配體對ALK1之結合。某些實施例中，抗體結合至選自GDF5、GDF6與GDF7所構成之群組的配體。抗體可以低於 $5 \times 10^{-8}$  M的 $K_D$ 結合至ALK1配體。可針對抑制ALK1配體所刺激之血管新生來選擇抗體。CAM試驗係選擇所欲抗體之適當試驗系統。上述抗體較佳係重組抗體。配方可進一步包括一或更多下列藥劑：培加尼布、雷珠單抗或醣皮質素。一實施例中，配方係實質無熱源。

申請案亦提供治療眼睛之血管新生相關疾病的方法，其包括對眼睛施加包括ALK1-Fc融合蛋白之眼用藥學配方，ALK1-Fc融合蛋白包括：一聚胜肽，其之胺基酸序

列係至少 97%、98%或 99%相同於序列編號：1 之胺基酸序列 22-118，聚胜肽係融合至免疫球蛋白之 Fc 部分，且其中 ALK1-Fc 融合蛋白以低於  $1 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  結合至 GDF5、GDF7 與 BMP9 並以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1。一實施例中，融合蛋白具有序列編號：3 之序列。一實施例中，Fc 部分係來自人類 IgG1。一實施例中，融合蛋白係藉由在哺乳類細胞株表現序列編號：4 之核酸所產生。一實施例中，細胞株係中國倉鼠卵巢細胞株。配方可進一步包括一或更多下列藥劑：培加尼布、雷珠單抗或醣皮質素。一實施例中，配方係實質無熱源。

申請案亦提供治療眼睛之血管新生相關疾病的方法，其包括對眼睛施加包括一抗體之眼用藥學配方，該抗體結合至序列編號：1 之胺基酸 22-118 所構成之 ALK1 聚胜肽且抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體之結合：GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。一實施例中，抗體抑制至少一選自下列所構成之群組的 ALK1 配體所刺激之血管新生：GDF5、GDF6 與 GDF7。一實施例中，抗體以低於  $5 \times 10^{-8}$  M 的  $K_D$  結合至 ALK1 聚胜肽。另一實施例中，抗體以低於  $1 \times 10^{-10}$  M 的  $K_D$  結合至 ALK1 聚胜肽。一實施例中，抗體抑制 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 或 BMP10 所刺激之血管新生。配方可進一步包括一或更多下列藥劑：培加尼布、雷珠單抗或醣皮質素。一實施例中，配方係實質無熱源。

本揭露方法之一實施例中，血管新生相關疾病係選自



下列所構成之群組：腫瘤、對抗-VEGF 治療有抗性之腫瘤、多發性骨髓瘤腫瘤、轉移至骨頭之腫瘤、關節或骨頭發炎、類風濕性關節炎、糖尿病性視網膜病變、早產兒視網膜病變(retinopathy of prematurity)、斑部退化、角膜移植排斥、新生血管性青光眼與晶狀體後纖維增生症(retrolental fibroplasias)。

## 【實施方式】

### 1. 概述

ALK1 係 TGF- $\beta$  超家族配體之第 I 型細胞-表面受體，並亦稱為 ACVRL1 與 ACVRLK1。已經暗指 ALK1 為 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3 與 BMP-9 的受體(Marchuk 等人，Hum Mol Genet. 2003; Brown 等人，J Biol Chem. 2005 Jul 1; 280(26): 25111-8)。

小鼠中，ALK1 中的功能喪失突變導致多種發育血管組織中的異常(Oh 等人，Proc. Natl Acad. Sci. USA 2000, 97, 2626-2631; Urness 等人，Nat. Genet. 2000, 26, 328-331)。

人類中，ALK1 中的功能喪失突變係相關於遺傳性出血性血管擴張症(HHT，或 Osler-Rendu-Weber 症候群)，其中患者形成動靜脈畸形，其產生由動脈直接流動(交流)至靜脈(動靜脈分流)而不具有間隔的微血管床。具有 HHT 之患者的典型症狀包括復發性鼻出血(recurrent epistaxis)、胃腸道出血、皮膚與黏膜皮膚毛細血管擴張

以及肺、腦或肝臟血管組織中的動靜脈畸形(AVM)。

David 等人(Blood. 2007 Mar 1; 109(5): 1953-61.)與 Scharpfenecker 等人(J Cell Sci. 2007 Mar 15; 120(Pt 6): 964-72)的近期刊物斷定內皮細胞中 BMP9 與 BMP10 活化 ALK1, 且此活化的結果係抑制內皮細胞增殖與遷移。這些作用與那些促血管新生因子(例如, VEGF)正好相反。因此, 這些刊物斷定 BMP9 與 BMP10 本身係抗-血管新生因子, 並進一步斷定 ALK1 活化具有抗血管新生作用。相反地, 本揭露顯示 BMP9 與 BMP10 之拮抗劑(而不是致效劑)具有抗血管新生作用。

本揭露係關於發現包含 ALK1 細胞外區塊之部分的聚胜肽(「ALK1 ECD 聚胜肽」)可用於活體內抑制血管新生, 包括與 VEGF 無關的血管新生以及由多個血管新生因子(包括 VEGF、FGF 與 PDGF)介導之血管新生。本揭露部分地提供生理上 ALK1 的高親合力配體身分並顯示 ALK1 ECD 聚胜肽抑制血管新生。數據顯示即便在 ALK1 ECD 聚胜肽未顯示對 TGF- $\beta$ 1 有意義結合的實例中, ALK1 ECD 聚胜肽可發揮抗血管新生作用。再者, ALK1 ECD 聚胜肽抑制許多不同促血管新生因子(包括 VEGF、FGF 與 GDF7)所刺激之血管新生。因此, 本揭露提供 ALK1 調控系統的描述, 其中 ALK1 係 GDF5 類配體(包括 GDF6 與 GDF7)的受體, 並亦是 BMP9 類配體(包括 BMP10)的受體, 這兩類配體的親合性不同。再者, 本揭

露顯示 ALK1 與上述配體所介導之信號傳遞係活體內促血管新生，且抑制此調控系統具有有效的活體內抗血管新生作用。因此某些態樣中，本揭露提供 ALK1 調控系統的拮抗劑(包括受體或一或更多配體之拮抗劑)用於抑制血管新生，包括 VEGF-依賴性血管新生及與 VEGF 無關的血管新生兩者。然而，應當注意預期指向 ALK1 本身與指向 ALK1 ECD 聚胜肽之抗體具有不同作用。預期針對 ALK1 之全中和抗體(pan-neutralizing antibody)(一種抑制所有強與弱配體之結合的抗體)將抑制上述配體透過 ALK1 的信號傳遞，但不預期會抑制上述配體透過其他受體(諸如，GDF5-7 實例中的 BMPRIa、BMPRIb、BMPRII 以及 TGF $\beta$  實例中的 BMP9-10、TBRI 與 TBRII)之信號傳遞的能力。另一方面，預期 ALK1 ECD 聚胜肽將抑制所有其緊密結合之配體，包括實施例中顯示之構築體、GDF5-7 與 BMP9-10；但不會影響其虛弱結合之配體，例如 TGF- $\beta$ 。因此，當針對 ALK1 之全中和抗體阻擋 BMP9 與 TGF- $\beta$  透過 ALK1 的信號傳遞時，其不會阻擋 BMP9 與 TGF- $\beta$  透過另一受體的信號傳遞，且當 ALK1 ECD 聚胜肽可抑制 BMP9 透過所有受體(甚至 ALK1 以外之受體)的信號傳遞時，並不預期其抑制 TGF- $\beta$  透過任何受體(甚至係 ALK1)的信號傳遞。

除非另有明示，否則本文所述之蛋白係人類形式。蛋白的 Genbank 參考如下：人類 GDF5，CAA56874；人類

GDF6, AAH43222; 人類 GDF7, NP\_878248; 人類 BMP9, Q9UK05; 人類 BMP10, O95393; 人類 DAN, BAA92265。ALK1 序列係於第 1-5 圖中提出。

人類 DAN 胺基酸序列(序列編號: 10) (Genbank BAA92265):

MLRVLVGAVL PAMLLAAPP INKLALFPDK SAWCEAKNIT QIVGHSCEA KSIONRACLG  
OCFSYSVPNT FPOSTESLVH CDSCMPAOSM WEIVTLECPG HEEVPRVDKL VEKILHCSCO  
ACGKEPSHEG LSVYVQGEDG PGSQPGTHPH PHPHPHPGGQ TPEPEDPPGA PHTEEGAED

預期成熟的 DAN 蛋白對應於胺基酸 17-180。DAN 的保留性半胱胺酸結區塊對應於胺基酸 21-125 (底線)。

人類 DAN cDNA 序列(序列編號: 11) (Genbank BC012037):

gccgagcctc ctggggcgcc cgggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg  
ggcgcgcgcg ggctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctggtg ggggctgtcc  
tcctgccat gctactggt gccccaccac ccatcaacaa gctggcactg ttcccagata  
agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca cccagatcgt gggccacagc ggctgtgagg  
ccaagtccat ccagaacagg gcgtgcctag gacagtgcct cagctacagc gtccccaaca  
ccttcccaca gtccacagag tccttggttc actgtgactc ctgcatgcc a gccagtgcca  
tgtgggagat tgtgacgctg gagtgcggc gccacgagga ggtgccagg gtggacaagc  
tggtggagaa gatcctgcac tgtagctgcc aggcctgcg caaggagcct agtcacgagg  
ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggacg ggccgggatc ccagcccggc acccaccctc  
acccccatcc ccacccccat cctggcgggc agaccctga gcccgaggac ccccctgggg  
ccccccacac agaggaagag ggggctgagg actgaggccc cccaactct tcctcccctc  
tcatccccct gtggaatgtt ggggtctact ctctggggaa gtcaggggag aagctgaagc  
ccccctttgg cactggatgg acttggttc agactcggac ttgaatgctg cccggttgcc  
atggagatct gaagggcgcg ggtagagcc aagctgcaca atttaataata ttcaagagt  
gggggaggaa gcagaggtct tcagggtct ttttttggg ggggggtggt ctcttcctgt  
ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggagg ggaggaagt ggctgagcca ttgagtgtg  
ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggtcc ctgggggtgc agatggtact  
gctgaggtcc cgggcttagt gtgagcatct tgccagcctc aggcttgagg gagggtggg  
ctagaaagac cactggcaga aacaggagg tccggcccca caggtttccc caaggcctct  
caccctactt cccatctcca gggaagcgtc gcccagtg cactgaagt gccctccctc

```

agcggagggg tttgggagtc aggcctgggc aggaccctgc tgactcgtgg cgcgggagct
gggagccagg ctctccgggc ctttctctgg cttccttggc ttgcctggtg ggggaagggg
aggaggggaa gaaggaaagg gaagagtctt ccaaggccag aaggaggggg acaaccccc
aagaccatcc ctgaagacga gcatccccct cctctccctg ttagaaatgt tagtgccccg
cactgtgccc caagttctag gccccccaga aagctgtcag agccggccgc cttctccct
ctcccaggga tgctctttgt aaatatcgga tgggtgtggg agtgaggggt tacctccctc
gccccaaagt tccagaggcc ctaggcggga tgggctcgct gaacctcgag gaactccagg
acgaggagga catgggactt gcgtggacag tcagggttca cttgggctct ctctagctcc
ccaattctgc ctgcctcctc cctcccagct gcactttaac cctagaaggt ggggacctgg
ggggagggac agggcaggcg ggcccatgaa gaaagcccct cgttgccag cactgtctgc
gtctgtcttt ctgtgcccag ggtggctgcc agcccactgc ctctgcctg ggggtggcctg
gccctcctgg ctgttgcgac gcgggcttct ggagcttgct accattggac agtctccctg
atggaccctc agtcttctca tgaataaatt ccttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

DAN 前驅物的編碼序列對應於核酸 93-635。成熟 DAN 蛋白的編碼序列對應於核酸 141-632。DAN 之保留性半胱胺酸結部分的編碼序列對應於核酸 153-467。

在此揭露背景中以及各個詞彙應用的特定背景中，本說明說中應用之詞彙通常具有其在技術中的普遍涵義。在說明書中論述某些詞彙以提供從事者額外引導於描述本文揭露之組合物與方法以及如何產生並利用。由詞彙應用之特定背景中可清楚理解詞彙之任何應用的範圍或涵義。

## 2. 可溶的 ALK1 聚胜肽

自然存在之 ALK1 蛋白係穿膜蛋白，具有位於細胞外之部分蛋白(細胞外部分)以及位於細胞內之部分蛋白(細胞內部分)。本揭露之態樣包括含有 ALK1 細胞外區塊部

分之聚胜肽。

某些實施例中，本揭露提供「ALK1 ECD 聚胜肽」。詞彙「ALK1 ECD 聚胜肽」意圖代表包括或由自然存在之 ALK1 聚胜肽細胞外區塊之胺基酸序列所構成的聚胜肽，其包括或排除任何信號序列及信號序列 N-端的序列；或包括或由至少 33%相同於自然存在之 ALK1 聚胜肽細胞外區塊的胺基酸序列所構成，且選擇性至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或至少 100%相同於自然存在之 ALK1 聚胜肽之細胞外區塊序列，如序列編號：1 之胺基酸 34-95 的半胱胺酸結區域或半胱胺酸結加上細胞外區塊之 N-端與 C-端的額外胺基酸，例如序列編號：1 之胺基酸 22-118。同樣地，ALK1 ECD 聚胜肽可包括序列編號：2 之核苷酸 100-285、或其之靜默變體或在嚴格雜合條件下雜合至其之互補的核酸所編碼之聚胜肽，嚴格雜合條件通常係技術所習知的，例如包括在 65°C 下 50% v/v 甲醯胺、5x SSC、2% w/v 阻擋試劑、0.1% N-月桂肌胺酸、0.3% SDS 中雜合整夜並在例如約 65°C 下 5xSSC 中清洗。此外，ALK1 ECD 聚胜肽可包括序列編號：2 之核苷酸 64-384、或其之靜默變體或在嚴格雜合條件下雜合至其之互補的核酸所編碼之聚胜肽，嚴格雜合條件通常係技術所習知的，例如包括在 65°C 下 50% v/v 甲醯胺、5x SSC、2% w/v 阻擋試劑、

0.1% N-月桂肌胺酸、0.3% SDS 中雜合整夜並在例如約 65°C 下 5xSSC 中清洗。因此，詞彙「ALK1 ECD 聚胜肽」包括單離之 ALK1 聚胜肽細胞外部分、其之變體(包括例如在對應序列編號：1 之胺基酸 22-118 的序列包含不超過 2、3、4、5 或 10 個胺基酸取代、添加或刪除的變體且包括在對應序列編號：1 之胺基酸 34-95 的序列包含不超過 2、3、4、5 或 10 個胺基酸取代、添加或刪除的變體)、其之片段以及包含任何前述之融合蛋白，但在各個實例中，任何前述之 ALK1 ECD 聚胜肽較佳係保有針對一或更多 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 或 BMP10 的實質親合力。詞彙「ALK1 ECD 聚胜肽」明確地意圖排除任何全長自然存在之 ALK1 聚胜肽。一般而言，ALK1 ECD 聚胜肽將經設計以在生物恰當溫度、pH 水平與滲透壓下溶於水溶液中。

如上所述，本揭露提供與自然存在之 ALK1 聚胜肽共有特定程度之序列相同性或相似性的 ALK1 ECD 聚胜肽。爲了確定兩個胺基酸序列的相同百分比，針對最理想的比對意圖來排列序列(例如，可將缺口導入第一與第二胺基酸或核酸序列之一者或兩者以得到最理想排列，並爲了比對意圖可不理會非同源序列)。接著比對位在對應胺基酸位置之胺基酸殘基。當第一序列中之位置係由與第二序列中對應位置相同之胺基酸殘基所佔據，那麼分子在該位置處係相同的(本文所用之胺基酸「相同性」

係等同於胺基酸「同源性」)。兩個序列之間的相同性百分比係序列共有之相同位置數目的函數，並考慮需要導入以得到兩個序列之最理想排列之缺口數目、各個缺口長度。

可利用數學演算法達成序列之比對以及兩個序列間之相同百分比與相似百分比的確定。(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988 ; Biocomputing : Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M.與 Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; 及 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 與 Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。

一實施例中，利用 Needleman 與 Wunsch (J Mol. Biol. (48): 444-453 (1970))演算法來確定兩個胺基酸序列之間的相同性百分比，該演算法已經併入 GCG 軟體套件(可自 <http://www.gcg.com> 取得)之 GAP 程式中。特定實施例中，下列參數係用於 GAP 程式中：Blosun 62 矩陣或 PAM250 矩陣任一者，及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口加權以及 1、2、3、4、5 或 6 的長度加權。又另一實施例中，利用 GCG 軟體套裝(可自 <http://www.gcg.com>



取得)中之 GAP 程式來確定兩個核苷酸序列間之相同性百分比(Devereux, J., 等人, *Nucleic Acids Res.* 12(1): 387 (1984))。示範性參數包括利用 NWSgapdna.CMP 矩陣以及 40、50、60、70 或 80 的缺口加權以及 1、2、3、4、5 或 6 的長度加權。除非另有明示, 否則欲確定兩個胺基酸序列之間的相同性百分比係利用 GAP 程式, 該程式利用 Blosom 62 矩陣、10 的 GAP 加權以及 3 的長度加權, 且若上述演算法無法計算所欲之相同性百分比, 那麼應選擇本文所揭露之適當替代方案。

另一實施例中, 利用 E. Myers 與 W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989))的演算法(已經併入 ALIGN 程式(第 2.0 版)中)來確定兩個胺基酸序列之間的相同性百分比, 其利用 PAM120 加權殘基表(weight residue table)、12 的缺口長度罰分(penalty)與 4 的缺口罰分。

另一確定兩個胺基酸序列之間的最好整體排列之實施例利用基於 Brutlag 等人之演算法的 FASTDB 電腦程式(*Comp. App. Biosci.*, 6: 237-245 (1990))。序列排列中, 詢問與討論之序列均係胺基酸序列。上述總體序列排列之結果係以相同性百分比方式呈現。一實施例中, 利用基於 Brutlag 等人之演算法的 FASTDB 電腦程式來執行胺基酸序列相同分析(*Comp. App. Biosci.*, 6: 237-245 (1990))。特定實施例中, 用來計算胺基酸排列之相同性與相似性百分比之參數包括: 矩陣=PAM 150、k-變數值

組=2、錯配罰分(Mismatch Penalty)=1、連結罰分(Joining Penalty)=20、隨機群組長度(Randomization Group Length)=0、切斷分數(Cutoff Score)=1、缺口罰分(Gap Penalty)=5以及缺口大小罰分(Gap Size Penalty)=0.05。

某些實施例中，ALK1 ECD 聚胜肽包括自然存在之 ALK1 蛋白(例如，序列編號：1 之序列)的細胞外部分，且較佳係包括 ALK1 細胞外區塊之配體結合部分。某些實施例中，可溶的 ALK1 聚胜肽包括之一胺基酸序列係至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同於序列編號：1 之胺基酸 22-118 的胺基酸序列。某些實施例中，截斷之細胞外 ALK1 聚胜肽包括至少 30、40 或 50 個序列編號：1 之細胞外部分胺基酸序列的連續胺基酸。

較佳實施例中，ALK1 ECD 聚胜肽結合至一或更多 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 BMP10。ALK1 聚胜肽選擇性地不顯示對 TGF- $\beta$ 1 或 TGF- $\beta$ 3 的實質結合。可利用溶液或表面電漿子共振系統(例如，Biacore™ 系統)中的純化蛋白來評估結合。較佳的可溶 ALK1 聚胜肽將顯示抗血管新生活性。血管新生抑制活性的生物試驗包括雞胚胎絨毛膜(CAM)試驗、小鼠角膜微袋試驗(mouse corneal micropocket assay)、測量施加單離或合成之蛋白於植入腫瘤上作用的試驗。CAM 試驗係由 O'Reilly 等人在 "Angiogenic Regulation of Metastatic Growth" Cell,

vol. 79 (2), Oct. 1, 1994, pp. 315-328 中描述。簡單的說，將 3 天大的雞胚及完整卵黃與蛋分離並置入培養皿中。培養 3 天後，將含有欲測試蛋白之甲基纖維素盤施加至各個胚胎的 CAM。培養 48 小時後，觀察胚胎與 CAM 以確定是否已經抑制內皮生長。小鼠角膜微袋試驗包括將含有生長因子之片狀物以及另一含有疑似內皮生長抑制劑之片狀物植入小鼠角膜中，並觀察在角膜中變得複雜之微血管形態。其他試驗係描述於實施例中。

可藉由移除 ALK1 聚胜肽之細胞質尾部與穿膜區域來產生 ALK1 ECD 聚胜肽。或者，可藉由刪除來使穿膜區塊去活化、或藉由以親水胺基酸殘基取代通常構成穿膜區塊之恐水胺基酸殘基來使穿膜區塊去活化。任一實例中，產生實質親水性分布圖，這將減少脂質親合性並改善水溶解度。刪除穿膜區塊係較佳於以親水胺基酸殘基取代，因為其可避免導入可能的免疫表位。

ALK1 ECD 聚胜肽可額外地在 N-端包括任一不同引導序列。上述序列將讓胜肽表現並指向真核系統中的分泌路徑。參閱例如 Ernst 等人，U.S. Pat. No. 5,082,783 (1992)。或者，可利用自然 ALK1 信號序列來造成自細胞排出。可能的引導序列包括自然的、tPa 與蜜蜂蜂毒肽 (mellitin) 引導序列 (分別為序列編號：7-9)。取決於選擇之引導序列、應用之細胞類型與培養條件等其他變數，信號胜肽的處理會有所改變，因此成熟 ALK1 ECD 聚胜

肽(包括序列編號：5)之實際 N-端開始位置會在 N-端或 C-端方向任一者中平移 1-5 胺基酸。

某些實施例中，本揭露考慮到 ALK1 聚胜肽的特定突變以改變聚胜肽的糖化。可選擇上述突變以導入或排除一或共多糖化位置，諸如 O-連接或 N-連接糖化位置。天冬醯胺酸-連接之糖化辨別位置通常包括三胜肽序列，天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(或天冬醯胺酸-X-絲胺酸)(其中「X」係任一胺基酸)，其由適當的細胞糖化酵素明確地辨別。亦可藉由添加一或更多絲胺酸或蘇胺酸殘基至野生型 ALK1 聚胜肽序列或以一或更多絲胺酸或蘇胺酸殘基取代野生型 ALK1 聚胜肽序列來產生改變(針對 O-連接糖化位置)。多種在糖化辨別位置之第一或第三胺基酸位置之一或兩者的胺基酸取代或刪除(與/或第二位置的胺基酸刪除)造成修飾之三胜肽序列的無-糖化。另一提高 ALK1 聚胜肽上糖類部分數目的手段係藉由化學或酵素耦接配糖至 ALK1 聚胜肽。取決於應用之耦接模式，可將糖類附加至(a)精胺酸與組胺酸；(b)自由羧基基團；(c)自由氫硫基基團，例如半胱胺酸的那些基團；(d)自由羥基基團，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥脯胺酸的那些基團；(e)芳香族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸的那些基團；或(f)麩醯胺酸的醯胺基團。這些方法係描述於 WO 87/05330(1987 年 9 月 11 日出版)及 Aplin 與 Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 中，其在此

以參考資料併入。可化學與/或酵素地完成 ALK1 聚胜肽上存在之一或更多醣類部分的移除。化學去醣化可包括例如將 ALK1 聚胜肽暴露至化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此處理造成除了連接糖類(N-乙醯葡萄糖胺糖或 N-乙醯半乳糖)以外的大部分或所有糖類的斷裂，同時保留胺基酸序列完整。化學去醣化係進一步由 Hakimuddin 等人(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 以及 Edge 等人(1981) Anal. Biochem. 118: 131 所描述。可藉由利用 Thotakura 等人(1987) Meth. Enzymol. 138: 350 所述之多種內切-糖苷酶與外切-糖苷酶來達成 ALK1 聚胜肽上醣類部分的酵素切割。取決於應用之表現系統類型可適當地調整 ALK1 聚胜肽序列，因為哺乳類、酵母菌、昆蟲與植物細胞均可導入受到胜肽胺基酸序列影響之不同醣化型態。一般而言，將在提供適當醣化之哺乳類細胞株(諸如，HEK293 或 CHO 細胞株)中表現用於人類中之 ALK1 蛋白，然而預期亦可應用其他哺乳類表現細胞株、具有經設計醣化酵素之酵母菌細胞株以及昆蟲細胞。

此揭露進一步考慮到產生突變的方法，特別係 ALK1 聚胜肽組合突變以及截斷突變之群組；一群組合突變係特別有用於辨別功能性變體序列。篩選上述組合庫的目的係產生例如 ALK1 聚胜肽變體，其可作為致效劑或拮抗劑任一者，或者其一起具有新活性。多種篩選試驗係提供於下，且上述試驗可用來評估變體。例如，可針對

結合 ALK1 配體能力來篩選 ALK1 聚胜肽變體，以避免 ALK1 配體對 ALK1 聚胜肽的結合或干擾 ALK1 配體引起的信號傳遞。亦可在細胞式或活體內試驗中試驗 ALK1 聚胜肽或其變體之活性，特別係實施例揭露之任一試驗。

可產生組合衍生之變體，其相對於包括自然存在之 ALK1 聚胜肽之細胞外區塊的 ALK1 ECD 聚胜肽具有選擇性或大致提高的效力。同樣地，突變可造成變體具有與對應野生型 ALK1 ECD 聚胜肽截然不同的血清半生期。例如，可讓改變之蛋白變成對蛋白質裂解或其他造成破壞之處理更為穩定或更不穩定，或是排除自然 ALK1 ECD 聚胜肽或使其去活性。上述變體與編碼其之基因可藉由調節 ALK1 聚胜肽之半生期來改變 ALK1 ECD 聚胜肽水平。例如，短的半生期可造成更短暫的生物效應，並可更緊密地控制患者中的重組 ALK1 ECD 聚胜肽水平。Fc 融合蛋白中，在連接子(若有的話)與/或 Fc 部分中進行突變以改變蛋白的半生期。

可藉由編碼聚胜肽庫之基因的退化性庫產生組合式庫，各個聚胜肽包括可能的 ALK1 聚胜肽序列的至少一部分。例如，可酵素連接合成寡核苷酸的混合物進入基因序列，以致可能的 ALK1 聚胜肽核苷酸序列之退化組可表現成個別的聚胜肽，或者表現成一組較大的融合蛋白(例如，噬菌體呈現)。

有許多方式可自退化性寡核苷酸序列產生可能的

ALK1 ECD 變體庫。可在自動 DNA 合成機中進行退化性基因序列的化學合成，並接著將合成之基因連接進入適當載體以進行表現。技術中習知退化性寡核苷酸的合成(參閱諸如，Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakura 等人，(1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura 等人，(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura 等人，(1984) *Science* 198: 1056; Ike 等人，(1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477)。上述技術已經應用於其他蛋白的定向演化(參閱諸如 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; 以及美國專利號 5,223,409、5,198,346 與 5,096,815)。

或者，可利用其他種突變方法來產生組合式庫。例如，可產生並利用下列方式篩選自庫中單離 ALK1 聚胜肽變體，方式諸如丙胺酸掃描突變方法等(Ruf 等人，(1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572; Wang 等人，(1994) *J. Biol. Chem.* 269: 3095-3099; Balint 等人，(1993) *Gene* 137: 109-118; Grodberg 等人，(1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 597-601; Nagashima 等人，(1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2888-2892; Lowman 等人，(1991) *Biochemistry* 30:

10832-10838; 與 Cunningham 等人, (1989) Science 244 : 1081-1085); 連接子掃描突變方法(Gustin 等人, (1993) Virology 193: 653-660; Brown 等人, (1992) Mol. Cell Biol. 12 : 2644-2652 ; McKnight 等人, (1982) Science 232 : 316); 飽和突變方法(Meyers 等人, (1986) Science 232 : 613); PCR 突變方法(Leung 等人, (1989) Method Cell Mol Biol 1 : 11-19); 或隨機突變方法, 包括化學突變方法等 (Miller 等人, (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY ; 與 Greener 等人, (1994) Strategies in Mol Biol 7 : 32-34)。連接子掃描突變方法特別在組合式設定中為具有吸引力的辨別 ALK1 聚胜肽之截斷(生物活性)形式之方法。

技術中習知許多技術用於篩選點突變與截斷產生組合性庫的基因產物, 以及針對該情勢用於針對具有某些特性之基因產物篩選 cDNA 庫。上述技術通常適合用於 ALK1 聚胜肽之組合性突變方法產生之基因庫的快速篩選。篩選大基因庫最廣泛應用的技術包括將基因庫選殖入可複製的表現載體中、以得到的載體庫轉形適當細胞、並在所欲活性之偵測有助於相當容易地單離載體(編碼偵測之產物的基因)的情況下表現組合性基因。較佳試驗包括 ALK1 配體結合試驗與配體-介導之細胞信號傳遞試驗。

某些實施例中, 本揭露之 ALK1 ECD 聚胜肽除了任何



自然存在於 ALK1 聚胜肽中之修飾外可進一步包括轉譯後修飾。上述修飾包括(但不限於)乙醯化、羧化、醣化、磷酸化、脂化與醢化。因此，修飾之 ALK1 ECD 聚胜肽可包含非-胺基酸成分，諸如聚乙二醇、脂質、多糖類或單糖類與磷酸根。可如同本文對其他 ALK1 ECD 聚胜肽變體所述般測試上述非-胺基酸成分在 ALK1 ECD 聚胜肽功能上的作用。當藉由在細胞中切割 ALK1 聚胜肽未成熟形式來產生 ALK1 ECD 聚胜肽時，轉譯後處理對蛋白的正確摺疊與/或功能亦是重要的。不同細胞(諸如，CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293)具有針對上述轉譯後活性的特定細胞裝置與獨特機制，並經選擇以確保 ALK1 聚胜肽的正確修飾與處理。

某些態樣中，ALK1 ECD 聚胜肽的功能性變體或修飾形式包括具有至少部分之 ALK1 ECD 聚胜肽與一或更多融合區塊的融合蛋白。上述融合區塊的習知實例包括(但不限於)聚組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽 S 轉移酶(GST)、硫氧還蛋白(thioredoxin)、A 蛋白、G 蛋白、免疫球蛋白重鏈恆定區(Fc)、麥芽糖結合蛋白(MBP)或人類血清白蛋白。可選擇融合區塊以給予所欲特性。例如，某些融合區塊特別有用於藉由親合性層析來單離融合蛋白。為了親合性純化之目的，應用親合性層析之相關基質，諸如結合麩胱甘肽之樹脂、結合澱粉酵素之樹脂與結合鎳之樹脂或結合鈷之樹脂。許多上述基質可以「套組」形式

取得，例如 Pharmacia GST 純化系統以及用於(HIS<sub>6</sub>)融合夥伴之 QIAexpress<sup>TM</sup> 系統(Qiagen)。另一實施例，可選擇融合區塊以促進 ALK1 ECD 聚胜肽的偵測。上述偵測區塊的實例包括不同的螢光蛋白(例如，GFP)以及「表位標誌」，其通常係短的胜肽序列(可取得其之特定抗體)。習知表位標誌(可輕易取得其之特定單株抗體)包括 FLAG、流感病毒凝血素(HA)與 c-myc 標誌。某些實例中，融合區塊具有蛋白酶切割位置(例如，Factor Xa 或 Thrombin 的切割位置)，其可讓相關蛋白酶部分地分解融合蛋白並因此由其釋出重組蛋白。接著可藉由隨後之層析分離將釋出之蛋白與融合區塊分離。某些較佳實施例中，ALK1 ECD 聚胜肽與在活體內穩定 ALK1 聚胜肽(「穩定子」區塊)之區塊融合。「穩定」意指任何提高血清半生期的事情，而不論這係因為破壞減小、腎臟清除減小或其他藥學動力學作用。習知與免疫球蛋白之 Fc 部分融合會給予多種蛋白所欲之藥學動力特性。同樣地，融合至人類血清白蛋白可給予所欲特性。可選擇之其他類型的融合區塊包括多聚體化(諸如，二聚體化、四聚體化)區塊與功能性區塊。

特定實施例，本揭露提供包含融合至 Fc 區塊之可溶的 ALK1 細胞外區塊之融合蛋白(例如，序列編號：6)。

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK\*

Fc 區塊選擇性具有一或更多突變位於諸如 Asp-265、離胺酸 322 與 Asn-434 殘基。某些實例中，具有一或更多這些突變(例如，Asp-265 突變)之突變 Fc 區塊具有減少的結合 Fc 受體能力(相對於野生型 Fc 區塊)。其他實例中，具有一或更多這些突變(例如，Asn-434 突變)之突變 Fc 區塊具有提高的結合 MHC 第 I 型-相關之 Fc-受體(FcRN)能力(相對於野生型 Fc 區塊)。

可理解可以任何方式(與所欲功能性相符)來排列融合蛋白之不同片段。例如，可將 ALK1 ECD 聚胜肽置於異源性區塊的 C-端，或者將異源性區塊置於 ALK1 ECD 聚胜肽的 C-端。ALK1 ECD 聚胜肽區塊與異源性區塊在融合蛋白中不需相鄰，且可在任一區塊之 C-端或 N-端或區塊之間包括額外的區塊或胺基酸序列。

本文所用之詞彙「免疫球蛋白 Fc 區」或簡單的「Fc」係可理解用來意指免疫球蛋白鏈恆定區(較佳係免疫球蛋白重鏈恆定區或其之部分)之羧基-端部分。例如，免疫球蛋白 Fc 區可包括 1) CH1 區塊、CH2 區塊與 CH3 區塊，2) CH1 區塊與 CH2 區塊，3) CH1 區塊與 CH3 區塊，4) CH2 區塊與 CH3 區塊，或 5) 二或更多區塊與免疫球蛋白鉸鏈區之組合。較佳實施例中，免疫球蛋白 Fc 區至少包括免疫球蛋白鉸鏈區、CH2 區塊與 CH3 區塊，且較佳係缺少 CH1 區塊。

一實施例中，重鏈恆定區衍生之免疫球蛋白類型係 IgG (Ig $\gamma$ ) ( $\gamma$  子集 1、2、3 或 4)。可應用其他類型的免疫球蛋白 IgA (Ig $\alpha$ )、IgD (Ig $\delta$ )、IgE (Ig $\epsilon$ )與 IgM (Ig $\mu$ )。適當免疫球蛋白重鏈恆定區的選擇係詳細論述於美國專利號 5,541,087 與 5,726,044 中。自某些免疫球蛋白類型與子集選擇特定免疫球蛋白重鏈恆定區序列而達到特定結果係視為技術習知水平。編碼免疫球蛋白 Fc 區之 DNA 構築體的部分較佳係包括至少一部分的鉸鏈區塊，且較佳係 Fc  $\gamma$  之 CH<sub>3</sub> 區塊的至少一部分或任何 IgA、IgD、IgE 或 IgM 中的同源區塊。

再者，考慮到免疫球蛋白重鏈恆定區中胺基酸的取代或刪除係有用於實行本文揭露之方法與組合物。一實施例係在上游 CH<sub>2</sub> 區中導入胺基酸取代以產生對 Fc 受體親合力減小之 Fc 變體(Cole 等人，(1997) J. Immunol. 159：3613)。

某些實施例中，本揭露產生可用的 ALK1 ECD 聚胜肽之單離與/或純化形式，其係單離自、或實質不具有(諸如，至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%不具有)其他蛋白與/或其他 ALK1 ECD 聚胜肽物種。通常藉由重組核酸表現來產生 ALK1 聚胜肽。

某些實施例中，本揭露包括編碼可溶的 ALK1 聚胜肽之核酸，其包括 ALK1 蛋白之細胞外部分的編碼序列。進一步實施例中，此揭露亦有關於包含上述核酸之宿主

細胞。宿主細胞可為任何原核或真核細胞。例如，本揭露之聚胜肽可表現於細菌細胞(例如，*E. coli*)、昆蟲細胞(例如，利用桿狀病毒表現系統)、酵母菌或哺乳類細胞中。熟悉技術人士習知其他適當宿主細胞。因此，本揭露之某些實施例進一步關於產生 ALK1 ECD 聚胜肽之方法。已經確定 ALK1-Fc 融合蛋白(提出於序列編號：3 中且表現於 CHO 細胞中)具有有效的抗血管新生活性。

可如同上述參照 ALK1 ECD 蛋白來產生與特性描述 DAN 聚胜肽，包括野生型 DAN 的變體以及包含 DAN 蛋白之融合蛋白。

### 3. 編碼 ALK1 聚胜肽之核酸

某些態樣中，本揭露提供編碼任一本文所揭露之 ALK1 聚胜肽(例如，ALK1 ECD 聚胜肽)(包括片段、功能性變體與融合蛋白)的單離與/或重組核酸。例如，序列編號：2 編碼自然存在之人類 ALK1 前驅聚胜肽，而序列編號：4 編碼融合至 IgG1 Fc 區塊之 ALK1 細胞外區塊前驅物。討論之核酸可為單股或雙股。上述核酸可為 DNA 或 RNA 分子。這些核酸可用於例如產生 ALK1 聚胜肽之方法中或用來作為直接治療劑(例如，反義、RNAi 或基因治療方法)。

某些態樣中，編碼 ALK1 聚胜肽之討論之核酸係進一步理解成包括序列編號：2 或 4 之變體的核酸。變體核苷酸序列包括差異為一或更多核苷酸取代、添加或刪除之序列，例如對偶基因變體。

某些實施例中，本揭露提供單離或重組核酸序列，其係至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%相同於序列編號：2 或 4。熟悉技術人士可理解與序列編號：2 或 4 互補之核酸序列以及序列編號：2 或 4 之變體亦位於本揭露之範圍內。進一步實施例中，本揭露之核酸序列可被單離、重組與/或與異源性核苷酸序列融合或於 DNA 庫中。

其他實施例中，本揭露之核酸亦包括在高度嚴格條件下雜合至序列編號：2 或 4 所表明之核苷酸序列的核苷

酸序列、序列編號：2 或 4 之互補序列或其之片段。如上所論述般，熟悉技術人士可輕易理解促進 DNA 雜合之適當嚴格條件可有所不同。熟悉技術人士可輕易理解促進 DNA 雜合之適當嚴格條件可有所不同。例如，可在約 45°C 下 6.0 x 氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)中實行雜合作用，接著在 50°C 下以 2.0 x SSC 清洗。例如，清洗步驟中的鹽濃度可選擇為 50°C 約 2.0 x SSC 的低嚴格度至 50°C 約 0.2 x SSC 的高嚴格度。此外，清洗步驟的溫度可由室溫(約 22°C)下的低嚴格度條件提高至約 65°C 的高嚴格條件。可改變溫度與鹽類兩者，或者可在其他變數改變時維持溫度或鹽類濃度恆定。一實施例中，本揭露提供在室溫下 6 x SSC 之低嚴格度條件雜合並接著在室溫下以 2 x SSC 清洗之核酸。

因為遺傳密碼退化性而與序列編號：2 或 4 提出之核酸不同的單離核酸亦位於本揭露之範圍中。例如，許多胺基酸係由超過一三聯體所指定。確定相同胺基酸之密碼子或同義密碼子(例如，CAU 與 CAC 係同義代表組胺酸)會造成「靜默」突變，其不會影響蛋白之胺基酸序列。然而，預期確實導致討論之蛋白之胺基酸序列改變的 DNA 序列多型(polymorphism)存在於哺乳類細胞之間。熟悉技術人士可理解這些在編碼特定蛋白之核酸中的一或更多核苷酸變化(高達約 3-5%的核苷酸)可存在於特定物種的個體之間(因為自然對偶基因變化)。任何與所有

上述核苷酸變化與得到之胺基酸多型係位於本揭露之範圍中。

某些實施例中，本揭露之重組核酸可在表現構築體中操作性連接至一或更多調控核苷酸序列。調控核苷酸序列通常係適合於用來表現之宿主細胞。技術中習知不同宿主細胞之多種類型的適當表現載體與適當調控序列。一般而言，上述一或更多調控核苷酸序列可包括(但不限於)啟動子序列、引導或信號序列、核糖體結合位置、轉錄開始與終止序列、轉譯開始與終止序列及增強子或活化子序列。本揭露亦考慮到技術中習知的持續型或誘發型啟動子。啟動子可為自然存在之啟動子或雜合啟動子(結合超過一啟動子之片段)之任一者。表現構築體可以附加體(例如，質體)方式存在於細胞中，或者表現構築體可插入染色體中。較佳實施例中，表現載體包含可篩選之標記基因以選擇經轉形之宿主細胞。技術中習知可篩選之標記基因並隨著應用之宿主細胞而有所不同。

本文揭露之某些態樣中，討論之核酸係提供於表現載體中，其包括編碼 ALK1 聚胜肽之核苷酸序列且操作性連接至至少一調控序列。調控序列係技術中所習知的並經選擇以引導 ALK1 聚胜肽的表現。因此，詞彙調控序列包括啟動子、增強子與其他表現控制片段。示範性調控序列係描述於 Goeddel; *Gene 表現 Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA



(1990)。例如，多種表現控制序列(在操作性連接至 DNA 序列時控制其之表現)之任何一個可用於這些載體以表現編碼 ALK1 聚胜肽之 DNA 序列。上述有用的表現控制序列包括諸如 SV40 的早期與晚期啟動子、tet 啟動子、腺病毒或巨細胞病毒早期立即啟動子、RSV 啟動子、lac 系統、trp 系統、TAC 或 TRC 系統、T7 啟動子(其之表現係由 T7 RNA 聚合酶所引導)、噬菌體  $\lambda$  之主要操作子與啟動子區、fd 塗層蛋白的控制區、3-磷甘油酸激酶或其他糖分解酵素的啟動子、酸性磷酸酶之啟動子(例如，Pho5)、酵母菌  $\alpha$ -交配因子之啟動子、桿狀病毒系統的多面體啟動子、以及其他習知控制原核或真核細胞或其之病毒之基因表現的序列與上述之不同組合。應當理解表現載體的設計可取決於上述因子，如欲被轉形之宿主細胞的選擇與/或欲被表現之蛋白類型。再者，應當考慮載體的複製數目(copy number)、控制複製數目與載體編碼之任何其他蛋白(例如，抗生素標記)表現的能力。

將選殖基因或其之部分黏合進入適合表現在原核細胞或真核細胞(酵母菌、鳥類、昆蟲或哺乳類)任一者或兩者中之載體來產生本揭露包括之重組核酸。產生重組 ALK1 聚胜肽之表現載體包括質體與其他載體。例如，適當載體包括下列類型的質體：pBR322-衍生之質體、pEMBL-衍生之質體、pEX-衍生之質體、pBTac-衍生之質體以及 pUC-衍生之質體，以表現於原核細胞(例如，*E.*

*coli.*) 中。

某些哺乳類表現載體包含原核序列(用以促進載體在細菌中增殖)與一或更多真核轉錄單元(表現於真核細胞中)兩者。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 與 pHyg 衍生之載體係適合真核細胞轉染之哺乳類表現載體實例。某部分這些載體係以細菌質體(例如，pBR322)之序列修飾以促進於原核細胞與真核細胞兩者中的複製與抗藥性篩選。或者，諸如牛乳突瘤病毒(BPV-1)或 Epstein-Barr 病毒(pHEBo、pREP-衍生與 p205)之病毒衍生物可用來短暫表現蛋白於真核細胞中。其他病毒(包括反轉錄病毒)表現系統的實例可見於下方基因治療輸送系統之描述中。技術中習知用來製備質體與宿主有機體轉形知不同方法。關於原核與真核細胞兩者的其他適當表現系統以及一般重組步驟，參閱 Sambrook, Fritsch 與 Maniatis 的 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。某些實例中，樂見藉由應用桿狀病毒表現系統來表現重組聚胜肽。上述桿狀病毒表現系統的實例包括 pVL-衍生之載體(諸如，pVL1392、pVL1393 與 pVL941)、pAcUW-衍生之載體(例如，pAcUW1) 與 pBlueBac-衍生之載體(例如，包含  $\beta$ -gal 之 pBlueBac III)。

較佳實施例中，將載體設計用來在 CHO 細胞中產生討論之 ALK1 聚胜肽，諸如 Pcmv-Script 載體 (Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4 載體 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 與 pCI-neo 載體 (Promega, Madison, Wisc.)。相當明顯，討論之基因構築體可用來造成培養基內增殖細胞中表現討論之 ALK1 聚胜肽，例如以產生蛋白 (包括融合蛋白或變體蛋白) 好進行純化。

本揭露亦關於以重組基因轉染之宿主細胞，重組基因包括一或更多討論之 ALK1 聚胜肽的編碼序列 (例如，序列編號：2 或 4)。宿主細胞可為任何原核或真核細胞。例如，本文揭露之 ALK1 聚胜肽可表現於細菌細胞 (例如，*E. coli*)、昆蟲細胞 (例如，利用桿狀病毒表現系統)、酵母菌或哺乳類細胞中。熟悉技術人士習知其他適當的宿主細胞。

因此，本揭露進一步關於產生討論之 ALK1 聚胜肽 (包括 ALK1 ECD 聚胜肽) 的方法。例如，以編碼 ALK1 聚胜肽之表現載體轉染之宿主細胞可培養於適當條件下好讓 ALK1 聚胜肽表現發生。ALK1 聚胜肽可被分泌且可自細胞與含有 ALK1 聚胜肽之培養基的混合物分離。或者，ALK1 聚胜肽可保留在細胞質或細胞膜部分中，並收集、裂解細胞且單離蛋白。細胞培養基包括宿主細胞、培養基與其他副產物。技術中習知細胞培養的適當培養基。討論之 ALK1 聚胜肽可自細胞培養基、宿主細胞或兩者

單離，利用技術中習知的純化蛋白技術，包括離子交換層析法、凝膠過濾層析法、超過濾、電泳、免疫親和性純化(以對 ALK1 聚胜肽之特定表位專一的抗體)及親和性純化(以結合融合至 ALK1 聚胜肽之區塊的試劑)(例如，A 蛋白管柱可用來純化 ALK1-Fc 融合物)。較佳實施例中，ALK1 聚胜肽係包含促進其純化之區塊的融合蛋白。較佳實施例中，藉由連續管柱層析步驟來達成純化，層析步驟包括例如任何順序的三或更多下列步驟：A 蛋白層析、Q 瓊脂糖凝膠(sepharose)層析、苯基瓊脂糖凝膠層析、大小排除層析與陽離子交換層析。純化可完成於病毒過濾與緩衝液交換。

另一實施例中，編碼純化引導序列(例如，重組 ALK1 聚胜肽之所欲部分 N-端的聚-(His)/腸激酶切割位置序列)之融合基因可讓表現之融合蛋白藉由利用  $\text{Ni}^{2+}$  金屬樹脂的親和性層析而加以純化。可接著以腸激酶處理來移除純化引導序列以提供純化之 ALK1 聚胜肽(例如，參閱 Hochuli 等人，(1987) *J. Chromatography* 411: 177; 與 Janknecht 等人，*PNAS USA* 88: 8972)。

習知產生融合基因的技術。實質上，依照常見技術來執行連結編碼不同聚胜肽序列的不同 DNA 片段，應用鈍端或交錯端來連結、限制酶剪切以提供適當端、適當地填滿黏性端、鹼性磷酸酶處理以避免不欲連接、以及酵素連結。另一實施例中，可藉由常見技術(包括自動 DNA

合成機)來合成融合基因。或者，可利用錨定引子(anchor primer)來實行基因片段的 PCR 擴增，錨定引子可引起兩個連續基因片段之間的互補突出而接著被黏合以產生嵌合式基因序列(參閱例如，*Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel 等人，John Wiley & Sons：1992)。

ALK1、BMP9、BMP10、GDF5、GDF6 或 GDF7 之拮抗劑的核酸化合物種類實例包括反義核酸、RNAi 構築體與催化性核酸構築體。核酸化合物可為單股或雙股。雙股化合物亦可包括突出或非互補區，其中一或其他股係單股。單股化合物可包括自我互補區，意謂著化合物形成稱為「髮夾」或「莖-環」的結構，具有雙螺旋結構區。核酸化合物可包括與一區域互補之核苷酸序列，該區域係由不超過 1000、不超過 500、不超過 250、不超過 100 或不超過 50、35、30、25、22、20 或 18 個全長 ALK1 核酸序列或配體核酸序列的核苷酸所構成。互補區域較佳係至少 8 個核苷酸，且選擇性至少 10 個或至少 15 個核苷酸，且選擇性介於 15 與 25 個核苷酸之間。互補區域可位於目標轉錄本的內子(intron)、編碼序列或非編碼序列，例如編碼序列部分。一般而言，核酸化合物將具有長度約 8 至約 500 個核苷酸或鹼基對的長度，且該長度選擇性為約 14 至約 50 個核苷酸。核酸可為 DNA (特別係用作反義時)、RNA 或 RNA：DNA 雜合體。任何一股可包括 DNA 與 RNA 的混合物以及無法輕易歸類成

DNA 或 RNA 任一者的修飾型態。同樣地，雙股化合物可為 DNA：DNA、DNA：RNA 或 RNA：RNA，且任何一股亦可包括 DNA 與 RNA 的混合物以及無法輕易歸類成 DNA 或 RNA 任一者的修飾型態。核酸化合物可包括多種修飾的任何一種，修飾包括一或更多對骨幹(自然核酸中的糖-磷酸根部分，包括核苷酸間之連接)或對鹼基部分(自然核酸之嘌呤或嘧啶部分)的修飾。反義核酸化合物較佳具有約 15 至約 30 個核苷酸的長度且通常包含一或更多修飾以改善特性，諸如血清、細胞或可能輸送化合物之位置(諸如，口服施加化合物實例中的胃以及吸入化合物的肺)中的穩定性。RNAi 構築體的實例中，與目標轉錄本互補之股通常係 RNA 或其之修飾。另一股可為 RNA、DNA 或任何其他變體。雙股或單股「髮夾」RNAi 構築體的雙股部分較佳係具有 18 至 40 個核苷酸的長度，且選擇性係約 21 至 23 個核苷酸的長度，如此長度可讓其作為 Dicer 基質。催化性或酵素性核酸可為核糖酶(ribozyme)或 DNA 酵素且亦可包含修飾形式。當核酸化合物在生理條件下且在無意義或有意義對照具有小或不具有作用的濃度下與細胞接觸時，其可抑制目標表現約 50%、75%、90%或更多。試驗核酸化合物作用的較佳濃度係 1、5 與 10 微莫耳(micromolar)。亦可試驗核酸化合物在例如血管新生上的作用。

可如同上參照編碼 ALK1 ECD 蛋白之核酸所述般產生並描述編碼 DAN 聚胜肽(包括野生型 DAN 的變體)之核酸以及那些編碼包含 DAN 蛋白之融合蛋白的核酸。

#### 4. 抗體

本揭露之另一態樣係關於與 ALK1 聚胜肽之細胞外部分反應的抗體，較佳係與 ALK1 聚胜肽專一性反應的抗體。較佳實施例中，上述抗體會干擾 ALK1 結合至配體，諸如 GDF5、GDF6、GDF7、BMP-9 或 BMP-10 - 應當理解針對 ALK1 之配體的抗體應當結合至相關蛋白的成熟、處理過形式。本揭露亦提供結合至 GDF5、GDF6、GDF7、BMP9 與 / 或 BMP10 且抑制 ALK1 結合至上述配體的抗體。較佳抗體將在生物試驗中呈現抗血管新生活性，生物試驗係諸如 CAM 試驗或角膜微袋試驗(參見上方)。

本文所用之詞彙「抗體」意圖包括全體抗體，例如任何同型(isotype) (IgG、IgA、IgM、IgE 等) 且包括與選定抗原反應之免疫球蛋白之片段或區塊。可利用傳統技術將抗體片段化，並針對效用與 / 或與關注之特定表位的交互作用來篩選片段。因此，詞彙包括能夠選擇性與某些蛋白反應之抗體分子的蛋白水解切割或重組製備部分的片段。上述蛋白水解與 / 或重組片段的非限制性實例包括 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab<sup>i</sup>、Fv 以及包含胜肽連接子接合之 V[L] 與 / 或 V[H] 區塊的單鏈抗體(scFv)。可共價或非共價地連

接 scFv 以形成具有二或更多結合位置的抗體。詞彙抗體亦包括抗體與重組抗體的多株、單株或其他純化製備物。詞彙「重組抗體」意指已經利用分子生物技術構築之核酸所表現之抗體或免疫球蛋白的抗原結合區塊，諸如人類化抗體或由單鏈抗體發展而來之完全人類抗體。單一區塊與單鏈抗體亦包括於詞彙「重組抗體」中。

可藉由技術習知的不同方法的任何一個來產生抗體，包括施加抗原至動物、施加抗原至帶有人類免疫球蛋白基因的動物、或以抗原對著抗體庫(通常係單鏈抗體或抗體區塊)的篩選。一但偵測到抗原結合活性，可將蛋白的相關部分移植進入其他抗體框架，包括全長IgG框架。例如，藉由利用衍生自ALK1聚胜肽或ALK1配體之免疫原，可藉由標準方案來產生抗-蛋白/抗-胜肽抗血清或單株抗體(參閱例如，Harlow與Lane的Antibodies: A Laboratory Manual ed. (Cold Spring Harbor Press: 1988))。可用胜肽的免疫形式(諸如，ALK1聚胜肽或能夠引出抗體反應的抗原片段或融合蛋白)來免疫哺乳類(諸如，小鼠、倉鼠或兔子)。給予蛋白或胜肽免疫原性的技術包括耦接至載體或其他技術中習知技術。可在佐劑存在下施加ALK1聚胜肽之免疫原部分(較佳係細胞外部分)。可藉由偵測血漿或血清中抗體效價來監控免疫反應進展。標準ELISA或其他免疫試驗可應用免疫原作為抗原來評估抗體水平。



以ALK1聚胜肽之抗原製備物免疫動物之後，可取得抗-ALK1抗血清，且若想要的話可自血清單離抗-ALK1多株抗體。爲了產生單株抗體，可自經免疫之動物取得產生抗體之細胞(淋巴細胞)，並藉由標準體細胞融合步驟與永生化細胞(例如，骨髓瘤細胞)融合以產生雜合瘤細胞。技術中習知上述技術，且包括諸如雜合瘤技術(最早由Kohler與Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497所開發)、人類B細胞雜合瘤技術(Kozbar等人, (1983) *Immunology Today*, 4: 72)與EBV-雜合瘤技術，以產生人類單株抗體(Cole等人, (1985) *Monoclonal Antidodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)。可針對產生與本揭露知哺乳類ALK1聚胜肽專一性反應的抗體來篩選雜合瘤細胞並自包含上述雜合瘤細胞之培養基單離單株抗體。

本文所用之詞彙抗體意圖包括與討論之ALK1聚胜肽之一專一性反應的其之片段。可利用傳統技術片段化抗體並以上述針對整個抗體篩選效用的相同方式來篩選片段。例如，可藉由以胃蛋白酶(pepsin)處理抗體來產生F(ab)<sub>2</sub>片段。得到之F(ab)<sub>2</sub>片段可經處理以減少雙硫鍵結好產生Fab片段。本揭露之抗體進一步意圖包括對ALK1聚胜肽具有親合性(由抗體之至少一CDR區所給予)之雙專一性、單鏈、與嵌合式與人類化分子。較佳實施例中，

抗體進一步包括與其附著且能被偵測之標記，該標記可為諸如放射性同位素、螢光化合物、酵素或酵素輔酶。

某些較佳實施例中，本揭露之抗體係重組抗體，特別係人類化單株抗體或全長人類重組抗體。

提及抗體所用之形容詞「專一性反應」係預期意指(且為技術中所普遍理解)抗體在關注之抗原(例如，ALK1聚胜肽或ALK1配體)與非關注之其他抗原之間係具有足夠選擇性，抗體最少有用於在特定類型的生物樣本中偵測關注之抗原的存在。某些應用抗體的方法中，樂見結合中較高程度的專一性。例如，用來在一或更多非關注之非常高含量蛋白存在下偵測關注之低含量蛋白的抗體若具有較高程度的選擇性(關注之抗原與其他交互反應物之間)的話表現較佳。單株抗體通常具有較高傾向來有效區別所欲之抗原與交互反應聚胜肽(相對於多株抗體)。此外，在一類型生物樣本(例如，糞便樣本)中有效選擇性辨別關注之抗原的抗體，在不同類型生物樣本(例如，血液樣本)中可能並不有效地選擇性辨別相同抗原。同樣地，在純化蛋白製備物(缺少其他生物物染物)中有效辨別關注之抗原的抗體，在粗製生物樣本(諸如，血液或尿液樣本)中可能並不有效地辨別關注之抗原。因此，較佳實施例中，本申請案提供已經在樣本類型(很可能是選擇應用抗體之樣本類型)顯示對關注之抗原之專一性的抗體。

影響抗體：抗原交互作用專一性的一特徵係抗體對抗原的親合力。雖然可以不同範圍的親合力來達到所欲知專一性，但較佳抗體通常具有約 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 或更少的親合力(解離常數)。已知TGF $\beta$ 對ALK1明顯低的結合親合性，預期許多抗-ALK1抗體將抑制TGF $\beta$ 結合。然而，GDF5、6、7類的配體以約 $5 \times 10^{-8}$  M的 $K_D$ 結合而BMP9、10配體以約 $1 \times 10^{-10}$  M的 $K_D$ 結合。因此，可選擇適當親合性之抗體來干擾這些配體的信號傳遞活性。

此外，用來篩選抗體以辨別所欲抗體之技術會影響得到之抗體的特性。例如，用於某些治療目的之抗體將較佳地能夠針對特定細胞類型。因此，為了得到此類型的抗體，樂於篩選結合至表現關注之抗原之細胞的抗體(例如，藉由螢光活化細胞分選)。同樣地，若抗體欲用於在溶液中結合抗原，樂見試驗溶液結合性。許多不同技術可用來試驗抗體：抗原交互作用以辨別特定所欲之抗體。上述技術包括ELISA、表面電漿子共振結合試驗(例如，Biacore結合試驗，Bia-core AB, Uppsala, Sweden)、三明治試驗(例如，IGEN International, Inc.的順磁珠系統，Gaithersburg, Maryland)、西方墨點法、免疫沉澱試驗及免疫組織化學。

## 5. 抗體與Fc-融合蛋白中的改變

本申請案進一步提供抗體、ALK1-Fc融合蛋白及具有

設計過或變體 Fc 區之 DAN-Fc 融合蛋白。上述抗體與 Fc 融合蛋白可用於例如調控作用子功能，諸如抗原依賴性細胞毒性(ADCC)與補體依賴性細胞毒性(CDC)。此外，修飾可改善抗體與 Fc 融合蛋白的穩定度。藉由導入適當核苷酸改變進入 DNA 或藉由胜肽合成來製備抗體與 Fc 融合蛋白之胺基酸序列變體。上述變體包括諸如在本文揭露之抗體與 Fc 融合蛋白之胺基酸序列中刪除與/或插入與/或取代殘基。則對最終構築體進行刪除、插入與取代的任何組合，前提是最終構築體具有所欲特性。胺基酸改變亦會改變抗體與 Fc 融合蛋白的轉譯後處理，例如改變醣化位置之數目或地點。

可藉由於胺基酸序列中導入改變來產生效應子功能減小之抗體與 Fc 融合蛋白，改變包括(但不限於)Bluestone 等人所述之 Ala-Ala 突變(參閱 WO 94/28027 與 WO 98/47531；亦可參見 Xu 等人，2000 Cell Immunol 200；16-26)。因此某些實施例中，恆定區中具有突變(包括 Ala-Ala 突變)的本揭露之抗體與 Fc 融合蛋白可用來減小或廢止效應子功能。根據這些實施例，抗體與 Fc 融合蛋白可包括位置 234 突變至丙胺酸或位置 235 突變至丙胺酸、或其之組合。一實施例中，抗體或 Fc 融合蛋白包括 IgG4 框架，其中 Ala-Ala 突變將描述位置 234 由苯丙胺酸至丙胺酸的突變與/或位置 235 由白胺酸至丙胺酸的突變。另一實施例中，抗體或 Fc 融合蛋白包括 IgG1 框架，其中 Ala-Ala 突變將描述位置 234 由白胺酸至丙胺酸的

突變與/或位置 235 由白胺酸至丙胺酸的突變。抗體或 Fc 融合蛋白可替代地或額外地帶有其他突變，包括 CH2 區塊中的點突變 K322A (Hezareh 等人，2001 J Virol. 75 : 12161-8)。

特定實施例中，抗體或 Fc 融合蛋白可經修飾以提高或抑制補體依賴性細胞毒性(CDC)。可藉由在 Fc 區導入一或更多胺基酸取代、插入或刪除來達到調控之 CDC 活性(參閱，例如美國專利號 6,194,551)。替代或額外地，可在 Fc 區中導入一或更多半胱胺酸殘基，藉此讓鏈間雙硫鍵形成於此區中。藉此產生之同元二聚型(homodimeric)抗體可具有改善或減小的內化能力與/或提高或降低的補體介導之細胞謀殺能力。參見 Caron 等人，J. Exp Med. 176 : 1191-1195 (1992)與 Shopes, B. J. Immunol. 148 : 2918-2922 (1992)、WO99/51642、Duncan & Winter Nature 322 : 738-40 (1988)；美國專利號 5,648,260、5,624,821 與 WO94/29351。

## 6. 調節血管新生、周圍細胞覆蓋與某些異常的方法與組合物

本揭露提供在哺乳類中抑制血管新生與/或提高周圍細胞覆蓋的方法，其藉由對受體施加有效劑量的 ALK1 ECD 聚胜肽(例如，ALK1-Fc 融合蛋白)、DAN 蛋白(例如，DAN-Fc 融合蛋白)或本文揭露之抗體(諸如，針對

GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、BMP10 或 ALK1 之 ECD 的抗體)或任何上述之核酸拮抗劑(諸如，反義或 siRNA)，通稱為「治療劑」。呈現之數據明確地指出本文揭露之抗血管新生治療劑可用來抑制哺乳類眼睛中之血管新生。預期這些治療劑亦可用於抑制骨頭與關節以及腫瘤(特別係與骨頭及關節相關之腫瘤)中之血管新生。

血管新生相關疾病包括(但不限於)血管新生-依賴性癌症，包括諸如實體腫瘤、血液產生之腫瘤(例如，白血病)與腫瘤轉移；良性腫瘤，諸如血管瘤、聽神經瘤、神經纖維瘤、氣管瘤(trachomas)、與化膿性肉芽腫；類風濕性關節炎；牛皮癬；虹膜紅變(rubeosis)；奧韋綜合症(Osler-Webber Syndrome)；心肌性血管新生(myocardial angiogenesis)；血小板新血管化(plaque neovascularization)；毛細管擴張(telangiectasia)；血友病關節(hemophilic joint)；及血管纖維瘤(angiofibroma)。

明確地說，本揭露之聚胜肽治療劑可用於治療或避免癌症(腫瘤)，且特別係例如習知依靠血管新生過程以支撐生長之癌症。不像大部分的抗血管新生劑，ALK1 ECD 聚胜肽對由多個因子所刺激之血管新生作用。這在癌症中相當有意義，因為癌症通常需要多個因子來支撐腫瘤血管新生。因此，本文揭露之治療劑將特別有用於治療

對以針對單一血管新生因子之藥劑(例如，貝伐單抗，其針對 VEGF)的處理有抗性之腫瘤。如本文所示，ALK1-Fc 融合蛋白係有效於降低黑色素瘤、肺癌、胰臟癌(例如，胰臟內分泌組織之腫瘤)、多發性骨髓瘤與乳癌(諸如，原發性乳癌或轉移性乳癌；動情素受體陽性(ER+)或動情素受體陰性(ER-))的病理作用。

多發性骨髓瘤係廣泛地被承認為包括顯著血管新生組成之癌症。因此，預期 ALK1-Fc 融合蛋白與其他本文揭露之治療劑將有用於治療多發性骨髓瘤與其他與骨頭相關之腫瘤。如本文所示，本文揭露之治療劑可用以減緩多發性骨髓瘤相關之骨頭傷害，並因此可用來減緩其他腫瘤(諸如，乳房或前列腺腫瘤)之骨頭轉移相關之骨頭傷害。如本文所示，GDF5-7 配體係高度表現於骨頭中，且雖然不希望受限於任何特定機制，但干擾這些配體會破壞骨頭中腫瘤發展所需之過程。

上述方法的某些實施例中，可一起(同時)或在不同時間(接連地)施加一或更多聚胜肽治療劑。此外，可搭配治療癌症或抑制血管新生的另一類型化合物來施加聚胜肽治療劑。

某些實施例中，可單獨應用本揭露之討論方法。或者，可搭配其他用於治療或避免增殖異常(例如，腫瘤)之傳統抗-癌症治療方法來應用討論之方法。例如，上述方法可用於預防性癌症避免、手術後癌症復發與轉移的避

免、及作為其他傳統癌症治療的輔助方法。本揭露確認可透過利用討論之聚胜肽治療劑來提高傳統癌症治療(諸如，化療、放射性治療、光線療法、免疫療法與外科手術)的有效性。

已經顯示許多傳統化合物具有抗-血管新生活性。這些化合物已經用為化療中的藥劑來縮減實體腫瘤、避免轉移與進一步生長、或減少白血病或骨髓惡性腫瘤中惡性細胞的數目。雖然化療已經有效於治療不同類型的惡性腫瘤，但許多抗-血管新生化合物會引發不欲之副作用。已經顯示在結合二或更多種不同治療時，治療會協同作用且可減少各個治療的劑量，藉此減少各個化合物在較高劑量下所發揮的有害副作用。其他實例中，對一治療有抗性之惡性腫瘤會對二或更多不同治療的組合性療法有所反應。

當搭配另一傳統抗-血管新生劑來施加本文揭露之聚胜肽治療劑時(同時或接連地)，上述治療劑可提高抗-血管新生劑之治療作用或克服對上述抗-血管新生劑的細胞抗性。這可減少抗-血管新生劑的劑量，藉此減少不欲之副作用、或恢復抗-血管新生劑在有抗性之細胞中的效力。

根據本揭露，可搭配其他治療疾病的組合物與步驟來應用本文揭露之抗血管新生劑。例如，可傳統地以外科手術、放射性或化學治療搭配 ALK1 或 ALK1 配體拮抗



劑來治療腫瘤，並接著隨之對患者施加拮抗劑以延長微轉移的休眠且穩定任何殘餘的原發腫瘤。

亦可對已知有發展新癌症或復發癌症高風險的個體預防性給予血管新生-抑制劑。因此，本揭露之態樣包括在受體中預防性避免癌症的方法，其包括對受體施加有效劑量的 ALK1 或 ALK1 配體拮抗劑與/或其之衍生物、或本揭露之另一血管新生-抑制劑。

如本文所示，ALK1-Fc 係有效於縮減類風濕性關節炎之鼠科模式的表現型。因此，本文揭露之治療劑可用於治療類風濕性關節炎與其他類型的骨頭或關節發炎。

某些正常的生理過程亦與血管新生有關，諸如排卵、月經與胎盤。本揭露之血管新生抑制蛋白係有用於治療內皮細胞之過度或異常刺激的疾病。這些疾病包括(但不限於)腸黏連(intestinal adhesion)、動脈硬化、硬皮症及肥厚性疤痕(hypertrophic scar)，即疤痕。其亦有用於治療具有血管新生作為病理結果之疾病，諸如貓抓病(Rochelominalia quintosa)與潰瘍(Helicobacter pylori)。

一般血管新生抑制蛋白可用作為生產控制劑，其藉由減少或避免胚胎植入所需之子宮血管化。因此，當對雌性施加足夠避免胚胎植入之抑制性蛋白數量時，本揭露提供有效的生產控制方法。生產控制方法的一態樣中，可在已經發生性交與受精之前或之後，施加足以妨礙胚胎植入的抑制性蛋白數量，藉此提供有效的生產控制方

法，可能係「黎明後」方法。雖然不欲受限於此項陳述，但威信抑制子宮內膜血管化會干擾囊胚的植入。相似的輸卵管黏膜血管化的抑制可干擾囊胚的植入，而避免輸卵管妊娠的發生。施加方法可包括(但不限於)藥丸、注射(靜脈內、皮下、肌肉內)、栓劑、陰道綿(vaginal sponge)、陰道棉球(vaginal tampon)與子宮內裝置。亦威信施加本揭露之血管新生抑制劑將干擾正常的胎盤血管增生、且亦干擾順利植入之囊胚與發育中胚胎與胎兒內的血管發育。

眼睛中，血管新生係與下列有關：諸如糖尿病性視網膜病變、早產兒視網膜病變、斑部退化、角膜移植排斥、新生血管性青光眼與晶狀體後纖維增生症。可藉由眼睛內或其他局部施加至眼睛的方式來施加本文揭露之治療劑。再者，如實施例所示，可全身性地施加 ALK1-Fc 並依然對眼睛血管新生具有所欲作用。

其他與眼睛血管新生相關之疾病包括(但不限於)流行性角膜結膜炎(epidemic keratoconjunctivitis)、維他命 A 缺乏、隱形眼鏡超戴症(contact lens overwear)、異位性角膜炎(atopic keratitis)、上輪部角膜炎(superior limbic keratitis)、翼狀贅片乾性角膜炎(ptyerygium keratitis sicca)、修格蘭氏症候群(sjogrens)、酒糟性痤瘡(acne rosacea)、phlyctenulosis、梅毒(syphilis)、分支桿菌感染(Mycobacteria infection)、脂質變性(lipid

degeneration)、化學灼傷(chemical burn)、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、單純皰疹感染(Herpes simplex infection)、帶狀疱疹感染(Herpes zoster infection)、原生動物感染(protozoan infection)、卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、蠶蝕性角膜潰瘍(Mooren ulcer)、特瑞思邊緣變性(Terrien's marginal degeneration)、邊緣角質層分離症(marginal keratolysis)、類風濕性關節炎、系統性狼瘡(systemic lupus)、多發動脈炎(polyarteritis)、傷口、韋格納氏類肉瘤(Wegeners sarcoidosis)、鞏膜炎(Scleritis)、史蒂文生強生症(Steven's Johnson disease)、類天疱瘡角膜放射狀切開(periphigoid radial keratotomy)及角膜移植排斥、鎌刀型貧血症、肉樣瘤(sarcoid)、彈力纖維性偽黃色瘤(pseudoxanthoma elasticum)、柏哲德氏症(Pagets disease)、靜脈阻塞(vein occlusion)、動脈阻塞(artery occlusion)、頸動脈阻塞性疾病(carotid obstructive disease)、慢性葡萄膜炎/玻璃膜炎(chronic uveitis/vitritis)、分支桿菌感染、萊姆病(Lyme's disease)、系統性紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus)、早產兒視網膜病變、愛爾氏病(Eales disease)、貝西氏病(Bechets disease)、造成視網膜炎或脈絡膜炎之感染、疑似演部組織胞漿菌病(presumed ocular histoplasmosis)、貝斯特病變(Bests disease)、近視、視盤小凹(optic pit)、斯特格病變(Stargarts disease)、睫狀體扁平部炎(pars planitis)、慢性視網膜

剝離、黏滯性過高症候群(hyperviscosity syndrome)、弓漿蟲症(toxoplasmosis)、傷口及雷射後併發症。其他疾病包括(但不限於)與虹膜紅變相關之疾病(角的新血管化)及維管組織或纖維組織之異常增殖所導致之疾病(包括所有類型的增生性玻璃體視網膜病變)。

可藉由諸如全身性、局部性、眼內注射治療劑或藉由嵌入持續釋放裝置(釋出治療劑)來治療或避免眼睛的症狀。可以用藥學可接受之眼用載體來傳送治療劑，以致維持化合物接觸眼睛表面足夠的時間週期好讓化合物滲入角膜與眼睛的內部區域，諸如前房(anterior chamber)、後房(posterior chamber)、玻璃體、水樣液(aqueous humor)、玻璃狀液(vitreous humor)、角膜、虹膜/睫狀體、晶體、脈絡膜/視網膜與鞏膜。藥學可接受之眼用載體可為諸如藥膏、植物油或封裝材料。或者，本揭露之治療劑可直接注射進入玻璃狀液與水樣液。進一步替代中，可全身性施加(例如，靜脈內灌注或注射)化合物來治療眼睛。

可施加一或更多治療劑。本揭露之方法亦包括共同施加其他用來治療眼睛症狀的藥劑。當施加超過一個試劑或施加試劑與藥劑之組合時，施加可同時發生或接連發生。可藉由不同施加路徑或相同施加路徑來施加治療劑與/或藥劑。一實施例中，治療劑與藥劑可一起施加於眼用藥學配方中。

一實施例中，治療劑係藉由與其他藉由藥理機制來妨礙血管新生之藥劑同時施加來治療眼睛中血管新生相關之疾病。可與本揭露之治療劑同時施加之藥劑包括(但不限於)培加尼布(Macugen<sup>TM</sup>)、雷珠單抗(Lucentis<sup>TM</sup>)、鯊胺乳酸鹽(squalamine lactate) (Evizon<sup>TM</sup>)、肝素酶(heparinase)及糖皮質素(例如，曲安奈德(Triamcinolone))。一實施例中，提供之方法係用來治療血管新生相關之疾病，其藉由施加包含至少一本文揭露之治療劑與至少一下列藥劑的眼用藥學配方來治療：培加尼布(Macugen<sup>TM</sup>)、雷珠單抗(Lucentis<sup>TM</sup>)、鯊胺乳酸鹽(Evizon<sup>TM</sup>)、肝素酶及糖皮質素(例如，曲安奈德)。

## 7. 配方與有效劑量

本文揭露之治療劑可配置成藥學組合物。可以傳統方式利用一或更多生理可接受之載體或賦形劑來配置根據本揭露來應用之藥學組合物。上述配方依照大部分的調控需求通常係實質不具熱源。

某些實施例中，本揭露之治療方法包括全身性或局部性以植入物或裝置來施加組合物。當施加時，用於本揭露之治療組合物係不具熱源、生理可接受之形式。亦可選擇性包含 ALK1 信號傳遞拮抗劑以外之其他治療有用試劑於上述之組合物中，可在本文揭露之方法中與討論之化合物(諸如，ALK1 ECD 聚胜肽或任何本文揭露之抗

體)同時或接連地施加。

一般而言，可用腸胃外施加(特別係靜脈內或皮下)來施加本文揭露之蛋白治療劑。適合腸胃外施加之藥學組合物可包括一或更多 ALK1 ECD 聚胜肽或其他抗體搭配一或更多藥學可接受之無菌等張水溶液或非水溶液、分散液、懸浮液或乳狀液、或無菌粉末(可在應用之前重新構成無菌注射液或分散液)，其可包含抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、使配方與預期接受者之血液等張之溶質、或懸浮劑或增稠劑。可用於本揭露之藥學組合物的適當水性與非水性載體之實例包括水、乙醇、多元醇(諸如，甘油、丙二醇、聚乙二醇等)與上述之適當混合物、植物油(例如，橄欖油)及可注射之有機酯(例如，油酸乙酯)。可維持適當流動性，諸如藉由應用塗層材料(例如，卵磷脂)、在分散液實例中藉由維持所需微粒大小、及藉由應用表面活性劑。

一實施例中，本文揭露之抗體與 ALK1 ECD 蛋白係施加於眼用藥學配方中。某些實施例中，眼用藥學配方係無菌水溶液(較佳係具有適當注射濃度)、或是軟膏或藥膏。上述軟膏或藥膏通常包括本文揭露之一或更多抗體或 ALK1 ECD 蛋白溶解或懸浮於無菌藥學可接受之軟膏或藥膏基質，例如礦物油-白軟石蠟基質。軟膏或藥膏組合物中，亦可包括無水羊毛脂於配方中。同樣較佳地添加局部抗菌劑或氯丁醇至上述藥膏作為抗微生物劑。一

實施例中，無菌水溶液係如同美國專利號6,071,958中所述。

本揭露提供之配方可經改變以包括酸類與鹼類來調節pH；及包括緩衝劑來維持pH位於狹窄範圍中。可添加額外藥劑至配方。這些藥劑包括(但不限於)培加尼布、肝素酶、雷珠單抗或醣皮質素。藉由無菌操作或在製備之適當階段執行無菌化來製備根據本揭露之眼用藥學配方。

若想要的話可將組合物與配方呈現於包裝或分散裝置中，其可包含一或更多單位劑量形式(包含活性成分)。包裝可包括例如金屬或塑膠片，例如單板包裝(blister pack)。包裝或分散裝置可伴隨有施加之操作指南。

#### 實施例：

##### 實施例 1：ALK1-Fc 融合蛋白的表現

申請人構築可溶的 ALK1 融合蛋白，其具有融合至人類 Fc 之人類 ALK1 細胞外區塊(其間具有極小的連接子)或融合至鼠科 Fc 區塊之小鼠 ALK1(其間具有極小的連接子)。構築體係分別稱為 hALK1-Fc 與 mALK1-Fc。

自 CHO 細胞株純化之 hALK1-Fc 係顯示於第 3 圖中(序列編號：3)。顯著地，雖然人類 ALK1 蛋白之細胞外區塊常見的 C-端係序列編號：1 之胺基酸 118，發明者已

經確定樂於避免具有終結於麩醯胺酸殘基之區塊。因此，衍生自人類 ALK1 之序列編號：3 部分在 Q118 的 c-端包括兩個殘基，白胺酸與丙胺酸。因此，本揭露提供具有 ALK1 衍生之序列之 c-端的 ALK1 ECD 聚胜肽(包括 Fc 融合蛋白)，其係 Q118 的 1 至 5 個上游胺基酸(113-117，相對於序列編號：1)或下游胺基酸(119-123)。

hALK1-Fc 與 mALK1-Fc 蛋白係表現於 CHO 細胞株中。三個不同引導序列係：

(i) 蜜 蜂 蜂 毒 肽 (HBML) :  
MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (序列編號： 7)

(ii) 組 織 胞 漿 素 原 活 化 子 (TPA) :  
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (序列編號： 8)

(iii) 自然的： MTLGSPRKGLLMLLMALVTQG (序列編號： 9)。

利用 TPA 引導子且具有未經處理之胺基酸序列之選擇形式係顯示於第 4 圖中(序列編號： 5)。

此聚胜肽係由第 4 圖中顯示之核酸序列所編碼(序列編號： 4)。

純化可藉由一系列管柱層析步驟加以完成，包括例如三或更多下列(任何順序)：A 蛋白層析、Q 瓊脂糖凝膠層析、苯基瓊脂糖凝膠層析、大小排除層析與陽離子交換層析。純化可完成於病毒過濾與緩衝液交換。hALK1-Fc



蛋白係純化至>98%的純度(由大小排除層析所確定)與>95%的純度(由 SDS PAGE 所確定)。

蛋白產生與純化的過程中，發明者發現 hALK1-Fc 傾向表現成二聚體與較高級聚集體的混合物，其在變性、還原條件(例如，還原 SDS-PAGE)下顯露純粹時對施加至患者係有問題的。聚集體可為免疫原性或不充足的生物可利用性，且因為其之異質性，這些聚集體難以在樂於藥物發展之水平上描述藥學製備物的特性。因此，試驗不同方法以減小最終製備物中的聚集體數量。

一方法中，試驗許多不同的細胞培養基。IS CHO-CD (目錄編號 91119, Irvine Scientific, Santa Ana, CA)顯示聚集產物產生中顯著的減少，同時維持 hALK1-Fc 的高水平產生。此外，在 8.0 的 pH 下自恐水性交互作用管柱(例如，苯基瓊脂糖凝膠)洗提材料造成聚集產物的進一步解析。得到之材料係由高於 99%的二聚體所構成。與 R&D 系統所賣之 ALK1-Fc 融合蛋白(目錄編號 370-AL, Minneapolis, MN)的比較顯示 NSO 細胞中產生之此種蛋白係 84%的二聚體，而由大小排除層析顯示殘餘蛋白為高分子量物種。製備物的大小管柱剖面圖之比較係顯示於第 11 圖中。已經確認聚集體形成係 ALK1-Fc 產生中的顯著問題，預期可發展出其他方法，包括包含額外純化步驟的方法(雖然上述方法會造成較低產量的純化蛋白)。

## 實施例 2：ALK1-Fc 配體的辨別

ALK1 係 TGF $\beta$  家族成員的第 1 型受體。利用 Biacore™ 系統針對結合至人類 ALK1-Fc 融合蛋白來試驗 TGF $\beta$  家族的許多成員。TGF $\beta$  本身、GDF8、GDF11、BMP2 與 BMP4 均無法顯示實質結合至 hALK1-Fc 蛋白。BMP2 與 BMP4 顯示有限的結合。GDF5、GDF7 與 BMP9 分別顯示  $K_D$  值約  $5 \times 10^{-8}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M 與  $1 \times 10^{-10}$  M 的結合。基於 GDF5 與 GDF7 對 GDF6 的相似性，預期 GDF6 將以相似親合力結合。BMP10 係緊密相關於 BMP9 且亦預期可以相似親合力結合。

## 實施例 3：ALK1-Fc 與抗-ALK1 抗體在內皮細胞上作用的特性描述

利用受到四個接連共有 SBE 位置控制之冷光酶報導構築體(SBE4-luc)，其對 Smad1/5/8-介導之信號傳遞有所反應，發明者可在 HMVEC 細胞中且 hALK1-Fc 藥物或中性化 ALK1 專一單株抗體存在與不存在的情況下測量 BMP-9 介導之活性。以 rhBMP-9 (50ng/ml)刺激 HMVEC 細胞，其引發 Smad1/5/8-介導之轉錄活性，這可藉由 SBE4-luc 調控之轉錄向上調節的增加而加以驗證。hALK1-Fc 化合物(10 $\mu$ g/ml)或抗體(10 $\mu$ g/ml)在添加時會減小(各自將近 60%)此種轉錄反應，這代表 ALK1-Fc 的

存在明顯地降低 BMP9 信號傳遞，此外，BMP9 信號傳遞係有關於 ALK1 活性。

SMAD 磷酸化作用的活化係通常用來試驗上游活化素受體的活化作用。習知 ALK1 在由其之配體活化之後可調控 SMAD 蛋白 1、5 與 8 的磷酸化。在此，發明人添加 rhBMP-9 (50ng/ml) 以引發 HUVEC 細胞(一種人類內皮細胞株，其固有地表現 ALK1 受體)中 SMAD 磷酸化超過 30 分鐘的時間週期。在以配體處理細胞後 5 分鐘可以看見 SMAD 1/5/8 的磷酸化，並在整個 30 分鐘周期中維持磷酸化。相當低濃度之 hALK1-Fc (250ng/ml) 存在的情況下，SMAD 1/5/8 磷酸化係減少的，這證實此試劑可抑制內皮細胞中之 Smad1/5/8 活化。

為了評估 ALK1-Fc 在試管內系統中的血管新生效應，發明人試驗化合物在 Matrigel 基質上減少內皮細胞形成管的效力。此技術通常用來評估新血管作用，可提供快速與高度可再現性兩者之結果。內皮細胞生長補充物 (ECGS) 係用來引發 Matrigel 上之內皮細胞形成微管，且接著在超過 18 小時時間周期以藥物與 ECGS 兩者存在下索狀組織形成 (cord formation) 的減少來評估抗血管新生化合物的效力。如同預期般，相對於陰性對照組 (不添加處理) (這代表 Matrigel 基質上產生之內皮細胞索狀組織形成的基本水平)，添加 ECGS (200ng/ml) 會引發明顯的索狀組織形成 (第 5 圖)。一但添加 hALK1-Fc (100 ng/ml)

或 mALK1-Fc (100ng/ml)任一者，可明顯地減少索狀組織形成。所有樣本中管長度的最終定量顯示出 hALK1-fc 或 mALK1-Fc 的每個濃度減少新血管化至基本水平。此外，hALK1-Fc 與 mALK1-Fc 在強力促血管新生因子 ECGS 存在下維持著血管化的強力抑制，這顯示出比陰性對照組血管內皮抑制素(endostatin) (100ng/ml)更有效的抗血管新生活性。

#### 實施例 4：CAM 試驗

習知 VEGF 與 FGF 可刺激血管新生。CAM (雞胚胎絨毛膜)試驗系統係用來評估 GDF7 的血管新生作用。如第 6 圖所示，GDF7 以相似 VEGF 的效力來刺激血管新生。GDF5 與 GDF6 發現相似結果。

在 CAM 試驗中測試 ALK1-Fc 融合蛋白的抗血管新生活性。這些融合蛋白顯示在 VEGF、FGF 與 GDF7 所刺激之血管新生上的有效抗血管新生作用。參閱第 7 圖。BMP9 與 PDGF 在此試驗中顯示相對差的引發血管新生能力，但是上述這些因子的血管新生作用仍然受到 ALK1 的抑制。

在 CAM 試驗中比較 ALK1-Fc 蛋白與商業上可取得之抗血管新生的抗-VEGF 單株抗體。ALK1-Fc 蛋白具有與抗-VEGF 相比之下相似的效力。抗-VEGF 抗體貝伐單抗現今用來治療人類中之癌症與斑部退化。參閱第 8 圖。

有趣的是，抗-ALK1 抗體(R&D 系統)無法在此試驗系統中明顯地抑制血管新生。發明人預期這可能反應出不同物種中 ALK1 序列的差異。

#### 實施例 5：小鼠角膜微袋試驗

小鼠角膜微袋試驗係用來評估 ALK1-Fc 對小鼠眼睛中之血管新生的作用。腹膜內施加之 hALK1-Fc 可明顯地抑制眼睛血管新生。如第 9 圖所示，hALK1-Fc 與抗-VEGF 抑制眼睛血管新生至相同程度。以相同的重量/重量劑量來應用 hALK1-Fc 與抗-VEGF。當充滿 VEGF 之 Matrigel 栓植入非眼睛位置時可得到相似數據。

這些數據顯示 ALK1 的高親合力配體可促進血管新生而 ALK1-Fc 融合蛋白具有有效的抗血管新生活性。ALK1 的配體分為兩個種類，對 ALK1 具有中等親合力的 GDF5、6、7 群組以及對 ALK1 具有高親合力的 BMP9、10 群組。

GDF5、6 與 7 主要位於骨頭與關節，而 BMP9 係循環於血液中。因此，顯露有包括 ALK1、GDF5、6 與 7 之骨頭與關節的促血管新生系統以及包括 ALK1 與 BMP9 (且可能的 BMP10)之全身性血管新生系統。

#### 實施例 6：類風濕性關節炎的鼠科模式

鼠科膠原-引發之關節炎模式係公認的類風濕性關節炎模式。此研究中，以載體、抗-VEGF (貝伐單抗-作為陰性對照組，因為貝伐單抗不會抑制鼠科 VEGF)、或是 1 mg/kg、10 mg/kg 或 25 mg/kg 劑量的 mALK1-Fc (「RAP-041」)來治療 10 隻小鼠的群組。第 21 天膠原增加之後，關節炎分數(參見第 10 圖)與腳爪腫脹在所有群組中穩定地提高，在第 38 天左右到達高峰。以 mALK1-Fc 處理之小鼠(「RAP-041」)顯示兩者特徵分數的減少，特別係在最高劑量(25mg/kg)下，雖然減少並沒有達到統計顯著性。然而，明顯有劑量相關之趨勢。

在第 42 天研究結果，關節炎發生率在載體對照處理小鼠中達到 10/10、在貝伐單抗處理小鼠中達到 9/10、在 1mg/kg mALK1-Fc 處理群組中達到 8/10、且在 10mg/kg mALK1-Fc 處理群組中達到 9/10。在 25mg/kg mALK1-Fc 處理群組中，疾病發生率降低至 6/10。

#### 實施例 7：DAN 的配體結合特性

DAN 係分泌之胱胺酸結狀蛋白家族(抑制 BMP 活性)的成員。習知 DAN 可結合並拮抗 GDF5。發明人確定 DAN 亦緊密地結合至 GDF7，但不會結合至 BMP9。因此，發明人推斷 DAN 抑制 ALK1 位於骨頭與關節之配體的系列，且預期 DAN 係骨頭與關節相關之血管新生的有效拮抗劑。因此，DAN 可用於治療骨頭的癌症(諸如，多發性

骨髓瘤與骨頭轉移)、以及類風濕性關節炎與骨關節炎。

總結，這些實施例揭露之發現提供許多本文所述之試劑，用於活體內抑制血管新生(且特別係眼睛血管新生)。這些發現亦指出針對 GDF5、6 與 7 之試劑可用來選擇性抑制骨頭與關節的血管新生。這些發現更指出上述試劑可用來治療癌症與類風濕性關節炎。

實施例 8： ALK1-Fc 在 CAM 試驗中減少腫瘤血管新生

腫瘤如同任何組織般具有基本的營養與氧氣需求。雖然小腫瘤能夠通過擴散自鄰近血管取得足夠的數量，但隨著腫瘤大小的增加，必須藉由補充與維持現有微血管來確保營養。為了試驗 ALK1-Fc 蛋白透過血管抑制限制腫瘤生長的能力，發明人在黑色素瘤外植 CAM 試驗中試驗不同濃度的 mALK1-Fc。如同上述之 CAM 試驗，在各個雞蛋表面上產生小型窗口，經由此植入  $5 \times 10^5$  個 B16 黑色素瘤細胞。接著每天以 0.02 mg/ml mALK1-Fc、0.2 mg/ml mALK1-Fc 處理雞蛋或保持不處理長達一周。實驗結束時，小心地移除腫瘤、秤重且取得數位影像。源自以 mALK1-Fc 處理之 CAM 的腫瘤與未處理之 CAM 腫瘤相比顯示大小的明顯減少。腫瘤重量的定量顯示每天以 0.02 mg/ml 或 0.2 mg/ml mALK1-Fc 任一者處理之腫瘤的重量相對於未處理之 CAM 顯示 65%與 85%的減少(第 6E 圖)。總結，一但添加 ALK1-Fc 可明顯地抑制新血管化與

腫瘤生長(反應劑量方式)，這指出 ALK1-Fc 係強大的抗血管新生劑。

#### 實施例 9：肺癌實驗模式

爲了進一步證實 ALK1-Fc 在腫瘤進展上的作用，試驗一種肺癌的小鼠模式。透過尾巴靜脈將螢光標記之鼠科 Lewis 肺癌細胞(LL/2-luc)施加至白化 Black 6 小鼠。同一天，開始以腹膜內施加 PBS 對照(n=7)或 10mg/kg mALK1-Fc (n=7)任一者來處理小鼠。活體螢光影像顯示對照小鼠中位於肺部之腫瘤的實質發展，到達小鼠瀕死的程度並在植入後 22 天犧牲。相較之下，ALK1-Fc 處理之小鼠顯示肺部腫瘤的實質延遲生長並顯示第 22 天 100%的存活。參見第 12 圖。

這些數據顯示 ALK1-Fc 在肺癌的小鼠模式中對腫瘤生長具有實質效應且提供存活優點。

#### 實施例 10. ALK1-Fc 蛋白在胰臟腫瘤模式上的作用

SV40 大 T 抗原係致癌基因(oncogene)，其可表現在小鼠之許多不同組織中以促進小鼠中自發性、原位腫瘤的形成。這些腫瘤比起通常應用之移植模式更像自然存在之腫瘤。RIP1-Tag2 小鼠中，小鼠係經基因修飾以在胰島素啟動子之控制下表現 T 抗原，以致小鼠發展出明確位



於胰臟之內分泌組織中的腫瘤。發明人試驗 ALK1-Fc 在 RIP1-Tag2 腫瘤上的作用。

發明人發現 RIP1-Tag2 小鼠的胰臟組織經歷過一系列的階段，開始為正常的組織、接著發展出增生外觀、進行血管新生以發展出實質全新的血管系統、且最終變成完全構型之腫瘤。在這些不同階段監控組織中之 ALK-1 與 BMP9 表現。結果係顯示於第 13 圖中。ALK1 的表現在發展之血管新生階段的過程中達到高峰，而 BMP9 表現在整個腫瘤發展過程中持續增加。

在 10 周大(早期腫瘤發展)或 12 周大(成熟腫瘤發展)開始以 mALK1-Fc 或對照 Fc 處理 RIP1-Tag2 小鼠(每隻小鼠 300 微克，或大約 12mg/kg，每周兩次持續兩周)。任一實例中，mALK1-Fc 的處理實質上暫停腫瘤生長。參見第 14 圖。注意在 10 周大處理之小鼠的腫瘤體積無法在 10 周至 12 周之間增加，然而以對照 Fc 蛋白處理之小鼠在相同時間週期顯示三倍的腫瘤體積。同樣地，在 12 周大處理之小鼠的腫瘤體積無法在 12 周至 14 周之間增加，然而對照組顯示額外 30% 的腫瘤體積增加。

處理之與對照腫瘤的螢光染色顯示出 mALK1-Fc 處理造成血管化的減少，藉由染色 CD31(內皮細胞的標記)來測量。第 15 圖。顯著地，mALK1-Fc 處理造成腫瘤血管組織周圍細胞覆蓋的提高，由 NG2 陽性細胞(周圍細胞)比上 CD31 陽性細胞的比例所測量。第 16 圖。周圍細胞

係形成血管部分的細胞且在調控血管穩定性與滲透性中扮演重要角色。ALK1-Fc 處理 CaLu6 非-小細胞肺癌細胞株移植腫瘤模式中發現相似的周圍細胞覆蓋提高。

這些數據共同地顯示 ALK1-Fc 係 RIP1-Tag2 小鼠中形成之自發、原位胰臟腫瘤中之腫瘤生長的有效抑制劑，且腫瘤抑制係相關於腫瘤血管化顯著的減少與腫瘤血管組織周圍細胞覆蓋顯著的增加。後者與腫瘤生物學相關的意義仍待釐清。然而，應當注意糖尿病性視網膜病變的病狀大部分歸因於周圍細胞的損失以及糖尿病性視網膜之血管的流體滲露。因此，這些數據顯示 ALK1-Fc 可用作抗-腫瘤/抗血管新生劑，且再者，此種試劑可用來促進血管化組織中周圍細胞的形成。

實施例 11. ALK1-Fc 融合蛋白在乳癌腫瘤模式上的作用

mALK1-Fc 係有效於延遲乳癌腫瘤細胞株(衍生自動情素受體陽性(ER+)與動情素受體陰性腫瘤細胞(ER-)兩者)的生長。

以冷光酶基因穩定地轉染 MDA-MB-231 乳癌細胞株(衍生自 ER-細胞)好在活體內偵測腫瘤生長與可能的轉移。此研究中，將  $1 \times 10^6$  個 MDA-MB-231-Luc 細胞原位地植入無胸線裸鼠(Harlan)的乳腺脂肪墊(fat pad)。藉由利用 IVIS 光譜成像系統 (Caliper Life Sciences)之生物

冷光偵測來注意腫瘤進展。冷光(偵測之光子數目)的提高對應於腫瘤負擔的增加。

注射  $1 \times 10^6$  個腫瘤細胞進入三十隻雌性裸鼠之乳腺脂肪墊。腫瘤植入後三天，藉由每週兩次皮下(SC)注射載體對照或 mALK1-Fc (30 mg/kg)任一者來處理小鼠。持續處理並藉由生物冷光成像監控腫瘤進展 10 周。如同生物冷光偵測所確定般，30 mg/kg 下的 mALK1-Fc 處理相對於載體處理之對照組可減緩腫瘤進展(第 17 圖)。mALK1-Fc 的處理可減緩但無法逆轉此模式中的腫瘤生長。可以預期有抗血管新生化合物在腫瘤中，腫瘤需要新血管形成以支援繼續成長之前可存活至某種大小。相似實驗中，hALK1-Fc 在如 3 mg/kg 一樣低的劑量水平下產生相似(若輕微地較小)作用。

亦在原位植入模式中試驗動情素-受體-陽性(ER+)、冷光酶表現細胞株 MCF-7。此模式中，將  $17\beta$ -雌二醇的 60 天緩慢釋出片皮下植入雌性裸鼠。植入片兩天後，將  $5 \times 10^6$  個 MCF-7 腫瘤細胞植入乳腺脂肪墊。每週兩次藉由 IP 路徑以 3、10 與 30 mg/kg 的 hALK1-Fc、或載體對照組處理小鼠。以每週一次方式在 IVIS-Spectrum 成像機(Caliper Life Sciences)上藉由生物冷光成像注意腫瘤進展。載體處理小鼠中，腫瘤快速地進展直到研究第 26 天(第 18 圖)。第 26 天後，腫瘤冷光中有上下波動直到第 60 天研究結束(當雌二醇片耗盡時)。這些波動係因為此

模式的常見特徵，其中快速腫瘤生長會超過宿主動物的血管新生反應，導致腫瘤壞死與伴隨的冷光信號下降。殘餘的細胞持續生長而導致提高的信號。相較於載體處理之對照組，以 10 或 30 mg/kg 的 hALK1-Fc 處理之小鼠能夠在研究過程中維持腫瘤大小於恆定水平，這表示此分子在腫瘤生長上的有效作用。

### 併入參考

本文提及之所有刊物與專利在此以參考資料併入，如同明確且個別地指出各個單獨刊物或專利以參考資料併入。不一致的情況下，包括本文任何定義之本申請案將優先。

### 等效物

雖然本文明確地揭露討論之發明的特定實施例，但上述說明書係描述性且無限制性。熟悉技術人士在回顧此說明書與下方之申請專利範圍後能理解本發明的許多變化。應參照申請專利範圍及等效物的完整範圍、以及說明書及上述變化來確定本發明之完整範圍。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示人類類活化素激酶 1 (ALK1) 的胺基酸序列 (序列編號：1)。單底線顯示預料之細胞外區塊。雙底線

顯示細胞內區塊。信號胜肽與穿膜區塊係無底線。

第 2 圖顯示人類 ALK1 cDNA 之核酸序列(序列編號：2)。編碼序列係有底線。編碼細胞外區塊之部分係雙底線。

第 3 圖顯示人類 ALK1 之細胞外區塊與 Fc 區塊之融合的實例(序列編號：3)。hALK1-Fc 蛋白包括人類 ALK1 蛋白之胺基酸 22-120 在 C-端融合至連接子(底線)與 IgG1 Fc 區。

第 4 圖顯示用以表現序列編號：3 之 hALK1-Fc 聚胜肽的核酸序列。亦顯示編碼之胺基酸序列。引導序列係經切割以致 Asp 22 係分泌之蛋白的 N-端胺基酸。

第 5 圖顯示鼠科 ALK1-Fc (「RAP」)與人類 ALK1-Fc (「ACE」)在內皮細胞管形成試驗中的抗血管新生作用。所有濃度的 RAP 與 ACE 減少回應內皮細胞生長補充物(ECGF)的管形成程度至高於陽性對照血管內皮抑制素(endostatin)的程度。

第 6 圖顯示 GDF7 在雞胚胎絨毛膜(CAM)試驗中的血管新生作用。GDF7 作用係與 VEGF 作比較。

第 7 圖顯示人類 ALK1-Fc 融合在 CAM 試驗中的抗血管新生作用。hALK1-Fc 抑制 VEGF、FGF 與 GDF7 所刺激之血管新生。

第 8 圖顯示鼠科 ALK1-Fc (mALK1-Fc)、hALK1-Fc、

商業上可取得之抗-ALK1 單株抗體(抗-ALK1 mAb)與商業上可取得之中性化抗-VEGF 單株抗體的對照抗血管新生作用。ALK1-Fc 構築體的抗血管新生作用係與抗-VEGF 抗體的作用相比較。

第 9 圖顯示 hALK1-Fc 與抗-VEGF 抗體的活體內抗血管新生作用。hALK1-Fc 與抗-VEGF 具有在眼睛之血管新生上可比較的作用，如小鼠角膜微袋試驗所測量般。

第 10 圖顯示 mALK1-Fc 在類風濕性關節炎的鼠科膠原-引發之關節炎(CIA)模式中的作用。圖表顯示在 42 天觀察周期過程之膠原-引發 DBA/1 關節炎雄性小鼠中所測定之關節炎分數的中間群組(mean group)。RAP-041 係 mALK1-Fc。Avastin<sup>TM</sup> 係抗-VEGF 抗體，貝伐單抗。

第 11 圖顯示 hALK1-Fc (序列編號：3)與來自 R&D 系統 (Minneapolis, MN) 之 hALK1-Fc 融合蛋白藉由 Superose 12 10/300 GL 大小排除管柱 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 的解析。R&D 系統材料包含約 13% 的聚集蛋白(如圖示左手邊的尖峰所示)以及某些分子量較小的物種。序列編號：3 之材料係高於 99% 由適當分子大小的二聚體所構成。

第 12 圖顯示以 PBS (圓形)與 mALK1-Fc (三角形)處理之小鼠中來自冷光酶-表現之 Lewis 肺癌(LL/2-luc)細胞的螢光信號。將腫瘤細胞注射進入尾巴靜脈並在細胞施加當天開始處理(PBS 或 10mg/kg mALK1-Fc IP，每週兩

次)。在第 22 天將瀕死的 PBS-處理之小鼠犧牲。處理與對照組各自由七隻動物所構成( $n=7$ )。

第 13 圖顯示胰臟內分泌腫瘤之 RIP1-Tag2 小鼠模式中 ALK1 與 BMP9 在腫瘤發展的不同階段之表現水平。ALK1 表現在最大血管新生活性之階段過程中達到高峰，而 BMP9 表現在整個腫瘤發展中持續增加。

第 14 圖顯示 mALK1-Fc 處理在 RIP1-Tag2 小鼠中之腫瘤生長上的作用。在 10 周大或 12 周大任一者開始以 mALK1-Fc 或對照 Fc 任一者(各個實例中，每隻小鼠 300 微克，每週兩次)處理小鼠長達兩星期。mALK1-Fc 處理完全阻止腫瘤生長。

第 15 圖顯示以 mALK1-Fc 或對照 Fc 處理之 RIP1-Tag2 小鼠的腫瘤血管密度(CD31<sup>+</sup>細胞)。mALK1-Fc 處理減少腫瘤血管密度約 50%。

第 16 圖顯示以 mALK1-Fc 或對照 Fc 處理之 RIP1-Tag2 小鼠的腫瘤血管中之周圍細胞覆蓋(NG2<sup>+</sup>細胞與 CD31<sup>+</sup>細胞的比例)。mALK1-Fc 處理提高周圍細胞覆蓋約 100%。

第 17 圖顯示 mALK1-Fc 在原位移植模式上的作用，其利用 MDA-MB-231 細胞株，一種衍生自 ER-乳癌細胞之細胞株。30 mg/kg 的劑量下，mALK1-Fc 在移植腫瘤上具有明顯的生長延遲作用。

第 18 圖顯示 hALK1-Fc 在原位移植模式上的作用，其利用 MCF7 細胞株，一種衍生自 ER+乳癌細胞之細胞株。30 mg/kg 的劑量下，hALK1-Fc 在移植腫瘤上具有明顯的生長延遲作用。

【主要元件符號說明】



## SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA, INC.  
 LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD.  
 Grinberg, Asya  
 Knopf, John  
 Kumar, Ravindra  
 Pearsall, Robert S  
 Seehra, Jasbir  
 Pietras, Kristian

<120> 調節血管新生與周圍細胞組成的方法與組合物

<130> A0904.70003US01

<140> not yet assigned

<141> 2009-05-01

<150> US 61/050,168

<151> 2008-05-02

<150> US 61/144,131

<151> 2009-01-12

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 503

<212> PRT

<213> 人類

<400> 1

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala  
 1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val  
 20 25 30

Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly  
 35 40 45

Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln  
 50 55 60

Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg  
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn  
 85 90 95

His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln  
 100 105 110

Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala  
 115 120 125

Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg  
 130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser  
 145 150 155 160

## PI-10489序列表

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp  
165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe  
180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val  
195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu  
210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe  
225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile  
245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln  
260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe  
275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val  
290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr  
305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val  
325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala  
340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro  
355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln  
370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala  
385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly  
405 410 415

Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp  
420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr  
435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu  
450 455 460

PI-10489序列表

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu  
465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro  
485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln  
500

<210> 2  
<211> 1512  
<212> DNA  
<213> 人類

<400> 2  
atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgtgc tgatggcctt ggtgacccag 60  
ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct gcacgtgtga gagccacat 120  
tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg 180  
aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg cagggggcgc 240  
cccaccgagt tcgtcaacca ctactgtgc gacagccacc tcgtcaacca caacgtgtcc 300  
ctggtgctgg aggccaccca acctccttcg gacgagccgg gaacagatgg ccagctggcc 360  
ctgatcctgg gccccgtgtt ggccttgcgt gccctgggtg ccctgggtgt cctgggcctg 420  
tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cgtggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480  
agtctcatcc tgaaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540  
gactgcacca caggagtggt ctcagggttc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg 600  
caggttgcct tgggtggagt tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg 660  
tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtccttggtc 720  
cgggagactg agatctataa cacagtgttg ctcagacacg acaacatcct aggccttcac 780  
gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcactaccac 840  
gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg 900  
aggctagctg tgtccgcggc atcgggcctg gcgcacctgc acgtggagat cttcggtaca 960  
cagggcaaac cagccattgc ccaccgcgac ttcaagagcc gcaatgtgtt ggtcaagagc 1020  
aacctgcagt gttgcatcgc cgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat 1080  
tacctggaca tcggcaacaa cccgagagtg ggcaccaagc ggtacatggc acccgagggtg 1140  
ctggacgagc agatccgcac ggactgcttt gagtcctaca agtggactga catctgggcc 1200  
tttggcctgg tgctgtggga gattgcccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac 1260  
tatagaccac ccttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag 1320  
gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggcctggctgc agaccgggtc 1380  
ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgctggtacc caaacccttc tggccgactc 1440  
accgcgtctg ggatcaagaa gacactacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa 1500  
gtgattcaat ag 1512

<210> 3  
<211> 328  
<212> PRT

PI-10489序列表

<213> 人造序列

<220>

<223> 重組蛋白

<400> 3

Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu  
1 5 10 15

Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val  
20 25 30

Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys  
35 40 45

Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val  
50 55 60

Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu  
65 70 75 80

Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly  
85 90 95

Gln Leu Ala Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
130 135 140

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
145 150 155 160

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
165 170 175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
195 200 205

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
260 265 270

PI-10489序列表

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 4  
<211> 1075  
<212> DNA  
<213> 人造序列

<220>  
<223> 重組DNA

<400> 4  
gctagcacca tggatgcaat gaagagaggg ctctgctgtg tgctgctgct gtgtggagca 60  
gtcttcgttt cggccggcgc cgaccctgtg aagccgtctc ggggcccgt ggtgacctgc 120  
acgtgtgaga gccacatig caaggggcct acctgccggg gggcctggtg cacagtagtg 180  
ctggtgcggg aggaggggag gcacccccag gaacatcggg gctgcgggaa cttgcacagg 240  
gagctctgca ggggcccgcc caccgagttc gtcaaccact actgctgcga cagccacctc 300  
tgcaaccaca acgtgtccct ggtgctggag gccacccaac ctcttcgga gcagccggga 360  
acagatggcc agctggccac cgggtgtgga actcacacat gccaccgtg cccagcacct 420  
gaagccctgg gggcaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 480  
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 540  
gtcaagtica actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 600  
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 660  
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc 720  
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 780  
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 840  
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 900  
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc ccttctctcc tctacagcaa gctcaccgtg 960  
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1020  
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgagg aattc 1075

<210> 5  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> 人造序列

<220>  
<223> 重組蛋白

<400> 5

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
1 5 10 15

PI-10489序列表

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly  
20 25 30

Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr  
35 40 45

Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg  
50 55 60

His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys  
65 70 75 80

Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His  
85 90 95

Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro  
100 105 110

Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Thr Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser  
130 135 140

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
145 150 155 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
165 170 175

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
180 185 190

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
195 200 205

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
210 215 220

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr  
225 230 235 240

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
245 250 255

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
260 265 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
275 280 285

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
290 295 300

Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
305 310 315 320

PI-10489序列表

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
325 330 335

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
340 345 350

<210> 6  
<211> 225  
<212> PRT  
<213> 人類

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (43)..(43)  
<223> 殘基可選擇性突變至丙胺酸

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (100)..(100)  
<223> 殘基可選擇性突變至丙胺酸

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (212)..(212)  
<223> 殘基可選擇性突變至丙胺酸

<400> 6

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
85 90 95

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys  
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
165 170 175

PI-10489序列表

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
195 200 205

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
210 215 220

Lys  
225

<210> 7  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人造序列

<220>  
<223> 重組引導胜?

<400> 7

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile  
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala  
20

<210> 8  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人造序列

<220>  
<223> 重組引導胜?

<400> 8

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro  
20

<210> 9  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人造序列

<220>  
<223> 重組引導胜?

<400> 9

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala  
1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly  
20

<210> 10  
<211> 180  
<212> PRT



PI-10489序列表

<213> 人類

<400> 10

Met Leu Arg Val Leu Val Gly Ala Val Leu Pro Ala Met Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Ile Asn Lys Leu Ala Leu Phe Pro Asp Lys Ser Ala  
20 25 30

Trp Cys Glu Ala Lys Asn Ile Thr Gln Ile Val Gly His Ser Gly Cys  
35 40 45

Glu Ala Lys Ser Ile Gln Asn Arg Ala Cys Leu Gly Gln Cys Phe Ser  
50 55 60

Tyr Ser Val Pro Asn Thr Phe Pro Gln Ser Thr Glu Ser Leu Val His  
65 70 75 80

Cys Asp Ser Cys Met Pro Ala Gln Ser Met Trp Glu Ile Val Thr Leu  
85 90 95

Glu Cys Pro Gly His Glu Glu Val Pro Arg Val Asp Lys Leu Val Glu  
100 105 110

Lys Ile Leu His Cys Ser Cys Gln Ala Cys Gly Lys Glu Pro Ser His  
115 120 125

Glu Gly Leu Ser Val Tyr Val Gln Gly Glu Asp Gly Pro Gly Ser Gln  
130 135 140

Pro Gly Thr His Pro His Pro His Pro His Pro Gly Gly Gln  
145 150 155 160

Thr Pro Glu Pro Glu Asp Pro Pro Gly Ala Pro His Thr Glu Glu Glu  
165 170 175

Gly Ala Glu Asp  
180

<210> 11

<211> 2003

<212> DNA

<213> 人類

<400> 11  
gccgagcctc ctggggcgcc cgggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg 60  
ggcgcgcgcg ggctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctggtg ggggctgtcc 120  
tccctgccat gctactggct gccccaccac ccatcaacaa gctggcactg ttcccagata 180  
agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca ccagatcgt gggccacagc ggcigtgagg 240  
ccaagtccat ccagaacagg gcgtgcctag gacagtgctt cagctacagc gtccccaaca 300  
ccttcccaca gtccacagag tccctggttc actgtgactc ctgcatgccca gcccagtcca 360  
tgtgggagat tgtgacgctg gagtccccgg gccacgagga ggtgcccagg gtggacaagc 420  
tggtagagaa gatcctgcac ttagctgcc aggcctgcgg caaggagcct agtcacgagg 480  
ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggacg ggccgggata ccagcccggc acccaccctc 540

PI-10489序列表

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| acccccatcc ccacccccat cctggcgggc agacccctga gcccaggagac cccctgggg | 600  |
| ccccccacac agaggaagag ggggctgagg actgaggccc cccaactct tctccccctc  | 660  |
| tcatccccc tgggaatgtt gggctcact ctctggggaa gtcaggggag aagctgaagc   | 720  |
| ccccctttgg cactggatgg acttggcttc agactcggac ttgaatgctg cccggttgcc | 780  |
| atggagatct gaaggggagg ggttagagcc aagctgcaca atttaataata ttcaagagt | 840  |
| ggggagggaa gcagaggctct tcagggtctt tttttgggg ggggggttgt ctcttctgt  | 900  |
| ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggaggg ggaggaagtt ggctgagcca ttgagtgtg  | 960  |
| ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggicc ctgggggtgc agatgttact | 1020 |
| gctgaggctc cgggcttagt gtgagcatct tgccagcctc aggtttgagg gagggtggg  | 1080 |
| ctagaaagac cactggcaga aacaggaggc tccggcccca caggtttccc caaggcctct | 1140 |
| cacccactt cccatctcca gggaagcgtc gcccagtg cactgaagt gcctccctc      | 1200 |
| agcggagggg tttgggagtc aggcctgggc aggacctgc tgactcgtg cgcgggagct   | 1260 |
| gggagccagg ctctccgggc ctttctctgg ctctctggc ttgcctgtg ggggaagggg   | 1320 |
| aggaggggaa gaaggaaagg gaagagtctt ccaaggccag aaggaggggg acaaccccc  | 1380 |
| aagaccatcc ctgaagacga gcatccccct cctctccctg ttagaaatgt tagtgccccg | 1440 |
| cactgtgccc caagtcttag gccccccaga aagctgtcag agccggccgc ctctccctt  | 1500 |
| ctcccaggga tgctcttgt aaatacggga tgggtgtggg agtgagggt tacctccctc   | 1560 |
| gcccgaagt tccagaggcc ctaggcggga tgggctcgt gaacctcag gaactccagg    | 1620 |
| acgaggagga catgggactt gcgtggacag tcagggttca ctgggctct ctctagctcc  | 1680 |
| ccaattctgc ctgctctc cctccagct gcactttaac cctagaaggt ggggacctg     | 1740 |
| ggggagggac agggcaggcg ggcccatgaa gaaagcccc cgttgcccag cactgtctgc  | 1800 |
| gtctgtctt ctgtgcccag ggtggctgcc agcccacgc ctctgcctg ggttggcctg    | 1860 |
| gccctcctgg ctgttgcgac gcgggcttct ggagctgtc accattggac agtctccctg  | 1920 |
| atggaccctc agtcttctca tgaataaatt ccttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaa  | 1980 |
| aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa                                           | 2003 |

## 七、申請專利範圍：

1. 一種包含一 ALK1-Fc 融合蛋白之藥學製備物，該 ALK1-Fc 融合蛋白包括：一聚胜肽，其具有至少 97% 相同於序列編號：1 之胺基酸 22-118 序列的一胺基酸序列，該聚胜肽係融合至一免疫球蛋白之一 Fc 部分，其中至少 90% 的 ALK1-Fc 融合蛋白係以一二聚體形式存在，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白包括序列編號：3 之胺基酸序列。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白之 Fc 部分係一人類 IgG1 之一 Fc 部分。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白係由一哺乳類細胞株中序列編號：4 之核酸的表現所產生。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白係由一中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株中序列編號：4 之核酸的表現所產生。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該藥學製備物係一適合施加至眼睛的藥學製備物。

6. 如申請專利範圍第 1-5 項任何一項所述之藥學製備物，其中至少 95% 的 ALK1-Fc 融合蛋白係以二聚體形式存在。
7. 如申請專利範圍第 1-5 項任何一項所述之藥學製備物，其中至少 99% 的 ALK1-Fc 融合蛋白係以二聚體形式存在。
8. 一種 ALK1-Fc 融合蛋白，該 ALK1-Fc 融合蛋白包括：一聚胜肽，其具有至少 97% 相同於序列編號：1 之胺基酸 22-118 序列的一胺基酸序列，該聚胜肽係融合至一免疫球蛋白之一 Fc 部分，其中至少 90% 的 ALK1-Fc 融合蛋白係以一二聚體形式存在，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白包括序列編號：3 之胺基酸序列，在製備一藥學組成物上之用途，該藥學組成物係用於在一需要之哺乳類中抑制血管新生。
9. 一種 ALK1-Fc 融合蛋白，該 ALK1-Fc 融合蛋白包括：一聚胜肽，其具有至少 97% 相同於序列編號：1 之胺基酸 22-118 序列的一胺基酸序列，該聚胜肽係融合至一免疫球蛋白之一 Fc 部分，其中至少 90% 的 ALK1-Fc 融合蛋白係以一二聚體形式存在，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白包括序列編號：3 之胺基酸序列，在製備一藥

學組成物上之用途，該藥學組成物係用於在一需要之哺乳類中處理一腫瘤。

10. 一種 ALK1-Fc 融合蛋白，該 ALK1-Fc 融合蛋白包括：一聚胜肽，其具有至少 97%相同於序列編號：1 之胺基酸 22-118 序列的一胺基酸序列，該聚胜肽係融合至一免疫球蛋白之一 Fc 部分，其中至少 90%的 ALK1-Fc 融合蛋白係以一二聚體形式存在，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白包括序列編號：3 之胺基酸序列，在製備一藥學組成物上之用途，該藥學組成物係用於在一需要之哺乳類中處理一與血管新生相關之眼睛異常。

11. 一種 ALK1-Fc 融合蛋白，該 ALK1-Fc 融合蛋白包括：一聚胜肽，其具有至少 97%相同於序列編號：1 之胺基酸 22-118 序列的一胺基酸序列，該聚胜肽係融合至一免疫球蛋白之一 Fc 部分，其中至少 90%的 ALK1-Fc 融合蛋白係以一二聚體形式存在，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白包括序列編號：3 之胺基酸序列，在製備一藥學組成物上之用途，該藥學組成物係用於在一需要之哺乳類中處理類風濕性關節炎。

12. 如申請專利範圍第 8-11 項任何一項所述之用途，其中該藥學組成物更包括一抑制血管新生之第二試劑。

13. 如申請專利範圍第 9 項所述之用途，其中該腫瘤係選自下列所構成之群組：黑色素瘤、一肺腫瘤、多發性骨髓瘤、胰臟腫瘤與乳癌。
14. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白以低於  $1 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  結合至 BMP9。
15. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-Fc 融合蛋白以高於  $1 \times 10^{-6}$  的  $K_D$  結合至 TGF $\beta$ -1。
16. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-ECD 聚胜肽的 C-端胺基酸殘基不是序列編號：1 的麩醯胺酸 118 (Q118)。
17. 如申請專利範圍第 1 項所述之藥學製備物，其中該 ALK1-ECD 聚胜肽的 C-端胺基酸殘基為序列編號：1 的 P113、G114、T115、D116、G117、L119、A120、L121、I122，或 L123。

第 1 圖：人類類活化素受體激酶 1 (ALK-1) 的胺基酸序列  
(gi:3915750；序列編碼：1)

1 MTLGSPRKGL LMLLMALVTQ GDPVKPSRGP LVTCTCESPH CKGPTCRGAW CTVVLVREEG  
61 RHPOEHRGCG NLHRELCRGR PTEFVNHYCC DSHLCNHNVS LVLEATOPPS EOPGTDGOLA  
121 LILGPVLALL ALVALGVLGL WHVRRROEKO RGLHSELGES SLILKASEOG DSMLGDLLDS  
181 DCTTGSGSGL PELVORTVAR QVALVECVGK GRYGEVWRGL WHGESVAVKLFSSRDEOSWF  
241 RETEIYNTVL LRHDNILGFI ASDMISRNSS TOLWLITHYH EHGSLYDFLO ROTLEPHLAL  
301 RLAVSAACGL AHLHVEIFGT QGKPAIAHRD FKSRNVLVKS NLOCCIADLG LAVMHSQGS  
361 YLDIGNNPRV GTKRYMAPEV LDEQIRTDCE ESYKWTDIWA FGLVLWEIAR RTTVNGIVED  
421 YRPPFYDVVP NDPSFEDMKK VVCVDQQTPT IPNRLAADPV LSGLAQMMRE CWYPNPSARL  
481 TALRIKKTLO KISNSPEKPK VIO

第 1 圖

第 2 圖：人類類活化素受體激酶 1 (ALK-1) 的核酸序列(序列編碼：2)

1 atgacettgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgacccag  
 61 ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct gcacgttga gagccacat  
 121 tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgc ggaggaggg  
 181 aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgacac gggagctctg cagggggcgc  
 241 cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc  
 301 ctggtgctgg aggccaccca acctccttcg gacgagccgg gaacagatgg ccagctggcc  
 361 ctgatecctg gccccgtgct ggcttgcctg gccctggtgg ccctgggtgt cctgggcctg  
 421 tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cgtggcctgc acagcgagct gggagagtc  
 481 agtctcatcc tgaaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt  
 541 gactgcacca cagggagtggt ctcagggtc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg  
 601 caggttgctt tgggtggagt tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg  
 661 tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtcttggttc  
 721 cgggagactg agatctataa cacagtgttg ctcagacacg acaacatcct aggttcac  
 781 gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcactaccac  
 841 gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg  
 901 aggctagctg tgtccgcggc atgcggcctg gcgcacctgc acgtggagat cttcgggtaca  
 961 cagggcaaac cagccattgc ccaccgcgac ttcaagagcc gcaatgtgct ggtcaagagc  
 1021 aacctgcagt gttgcatcgc cgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat  
 1081 tacctggaca tcggcaacaa cccgagagtg ggcaccaagc ggtacatggc acccgaggtg  
 1141 ctggacgagc agatccgcac ggactgcttt gactcctaca agtggactga catctgggcc  
 1201 tttggcctgg tgctgtggga gattgcccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac  
 1261 tatagaccac ccttctatga tgtgtgtccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag  
 1321 gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agacccggtc  
 1381 ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgctggtacc caaacccctc tgcccgactc  
 1441 accgcgctgc ggatcaagaa gacactacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa  
 1501 gtgattcaat ag

第 2 圖



## 第 3 圖：ALK1-Fc 融合蛋白(序列編碼：3)

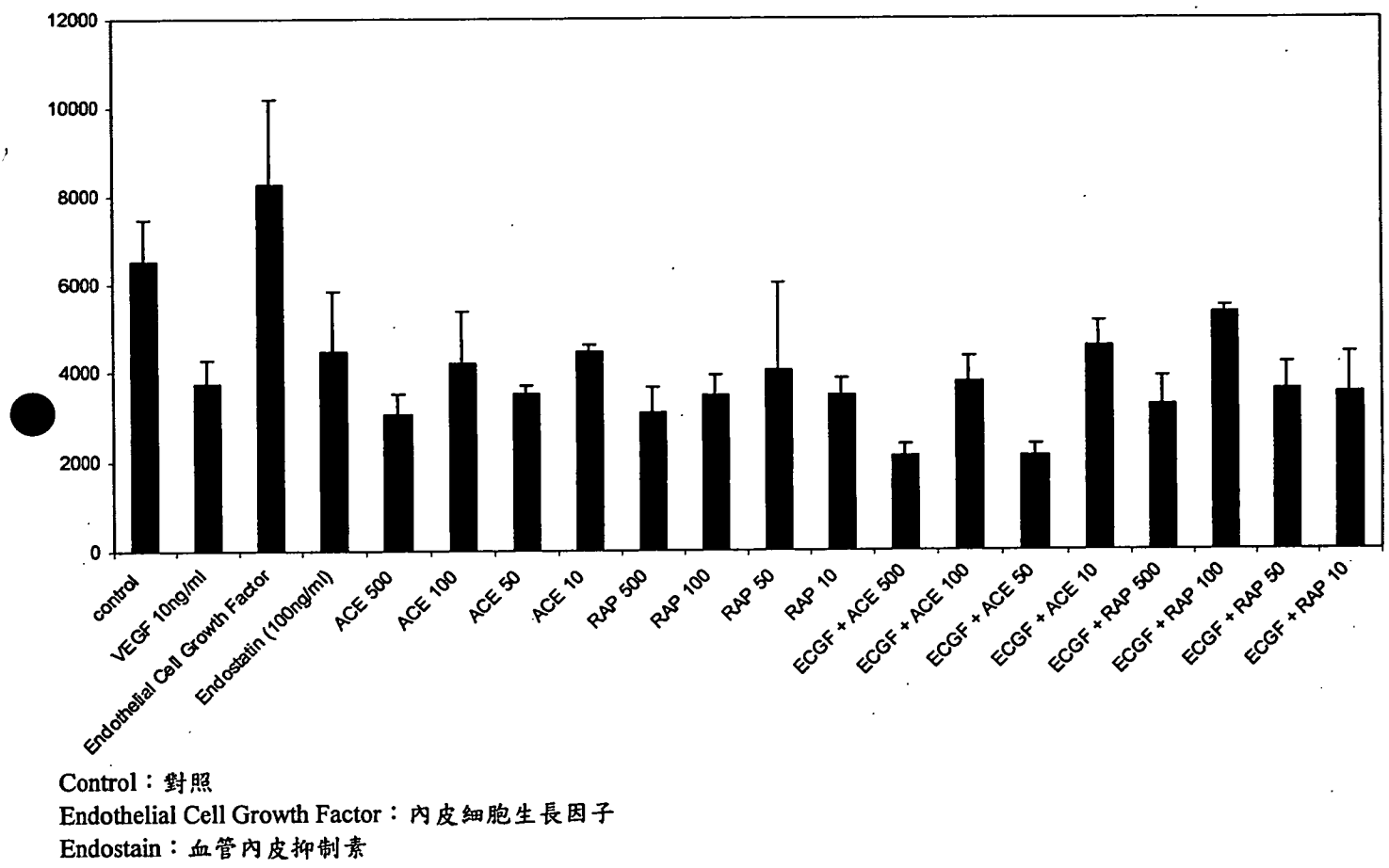
DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLH  
RELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPPSEQPGTDGQLATGGGT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEA  
LHNHYTQKSLSLSPGK

第 3 圖

第 4 圖：編碼 ALK1-Fc 表現構築體之核酸序列 (核酸序列，序列編碼：4；胺基酸序列，序列編碼：5)

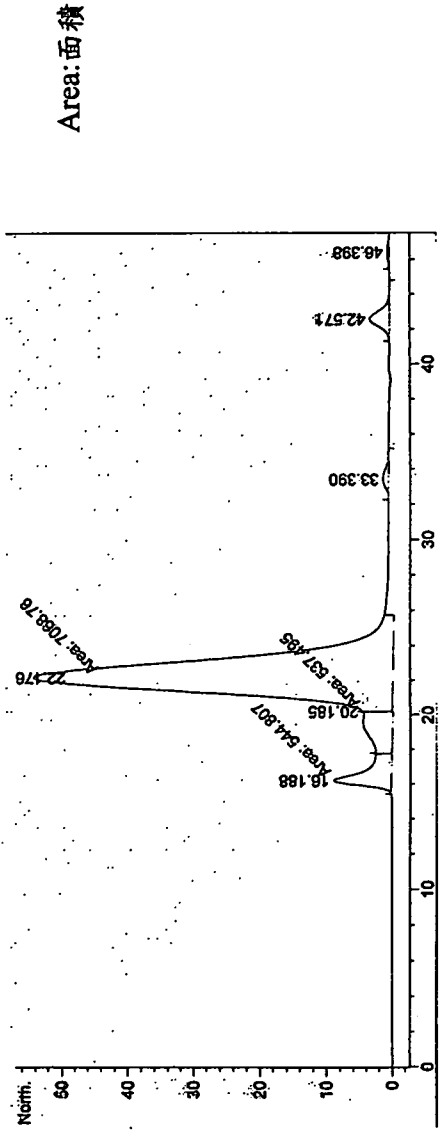
```
NheI | - - - - - CDS - - - - -
      | *   M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V *
      | *   *   *   20 *   *   *   40 *   *   *   60 *
GCTAGCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTT
      |
      | - - - - - CDS - - - - -
      | S P G A D P V K P S R G P L V T C T C E S P H C
      | *   *   *   80 *   *   *   100 *   *   *   120 *   *   *   140
CGCCCGGCGCGGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCGCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCACATTG
      | - - - - - CDS - - - - -
      | K G P T C R G A W C T V V L V R E E G R H P Q
      | *   *   *   160 *   *   *   180 *   *   *   200 *   *
CAAGGGGCTACCTGCCGGGGGCGCTGGTGACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAG
      | - - - - - CDS - - - - -
      | E H R G C G N L H R E L C R G R P T E F V N H
      | *   *   *   220 *   *   *   240 *   *   *   260 *   *   *   280
GAACATCGGGGCTCGGGAACTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGCGGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACT
      | - - - - - CDS - - - - -
      | Y C C D S H L C N H N V S L V L E A T Q P P S E
      | *   *   *   300 *   *   *   320 *   *   *   340 *   *
ACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCACCTCCTTCGGA
      |
      | - - - - - CDS - - - - -
      | Q P G T D G Q L A T G G G T H T C P P C P A P
      | *   *   *   360 *   *   *   380 *   *   *   400 *   *   *   420
GCAGCCGGGAACAGATGGCCAGCTGGCCACCGGTGGTGGAAGTACACATGCCACCGTGGCCAGCACCT
      | - - - - - CDS - - - - -
      | E A L G A P S V F L F P P K P K D T L M I S R
      | *   *   *   440 *   *   *   460 *   *   *   480 *   *
GAAGCCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGA
      | - - - - - CDS - - - - -
      | T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
      | *   *   *   500 *   *   *   520 *   *   *   540 *   *   *   560
CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGT
      | - - - - - CDS - - - - -
      | D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
      | *   *   *   580 *   *   *   600 *   *   *   620 *   *
GGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
      | - - - - - CDS - - - - -
      | V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
      | *   *   *   640 *   *   *   660 *   *   *   680 *   *   *   700
GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA
      | - - - - - CDS - - - - -
      | K A L P V P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
      | *   *   *   720 *   *   *   740 *   *   *   760 *   *
AAGCCCTCCAGTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
      | - - - - - CDS - - - - -
      | T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F
      | *   *   *   780 *   *   *   800 *   *   *   820 *   *   *   840
CACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
      | - - - - - CDS - - - - -
      | Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
      | *   *   *   860 *   *   *   880 *   *   *   900 *   *
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
      | - - - - - CDS - - - - -
      | P V L D S D G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
      | *   *   *   920 *   *   *   940 *   *   *   960 *   *   *   980
CCGTGCTGGACTCCGACGGCCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
      | - - - - - CDS - - - - -
      | G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
      | *   *   *   1000 *   *   *   1020 *   *   *   1040 *   *
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCC
      |
      | - - - - - CDS - - - - -
      | L S P G K *
      | *   *   *   1060 *   *   *
CTGTCTCCGGGTAAATGAGGAATTC
```

第 4 圖

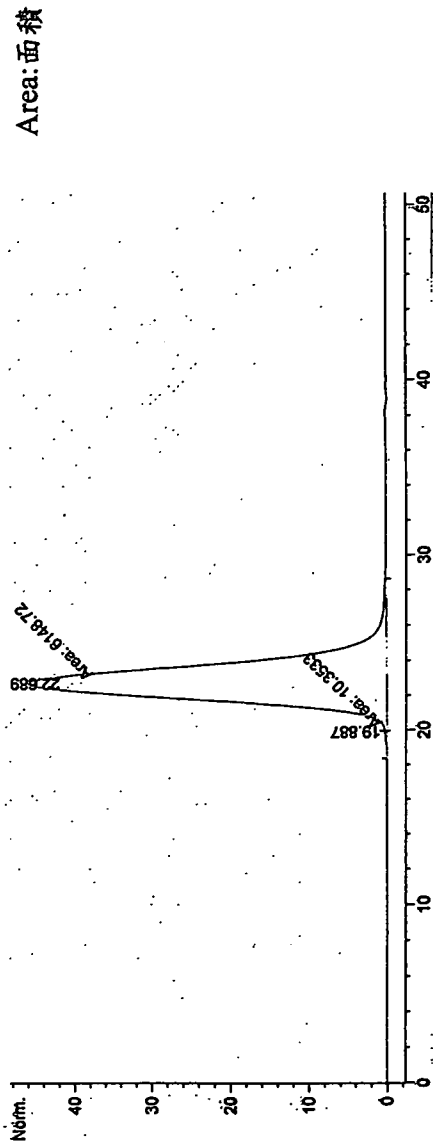


第 5 圖

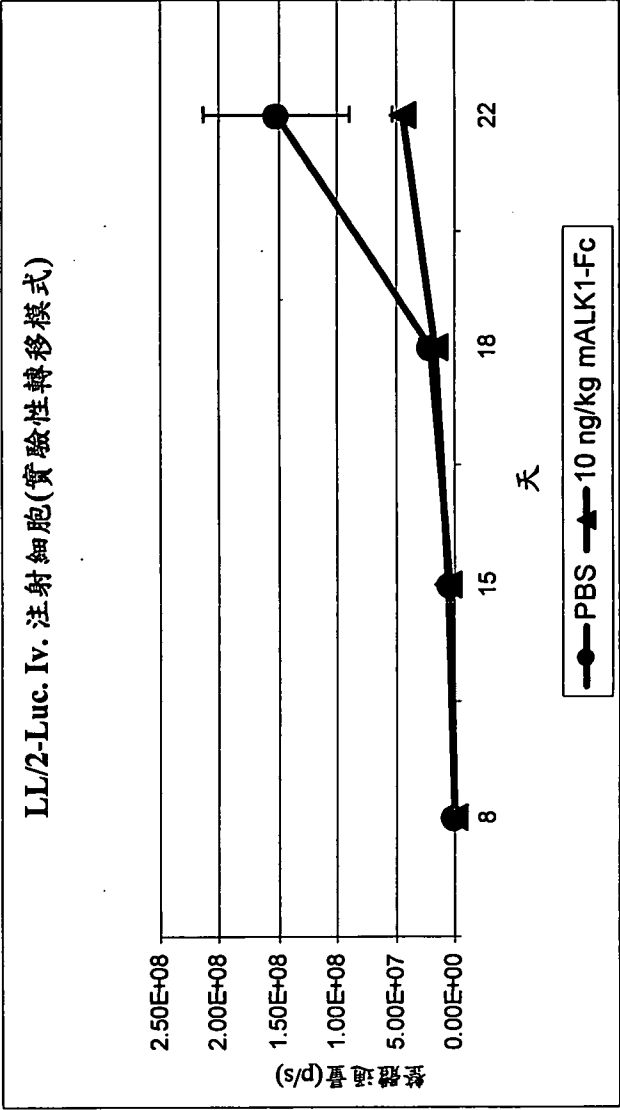
R&D 系統製備之 ALK1-Fc 融合蛋白



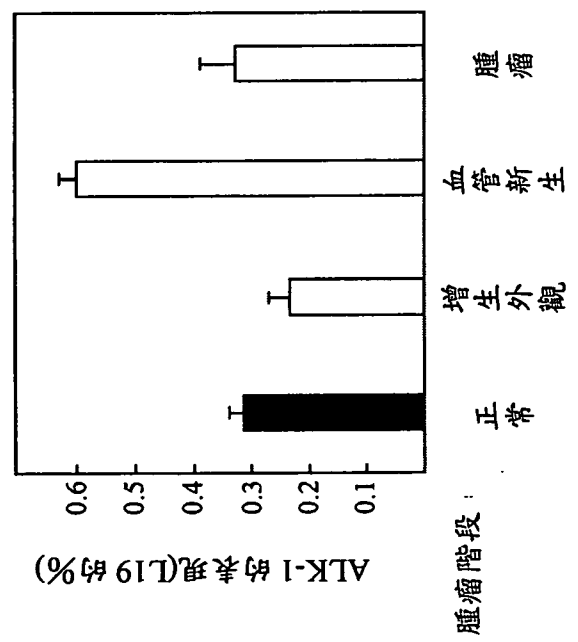
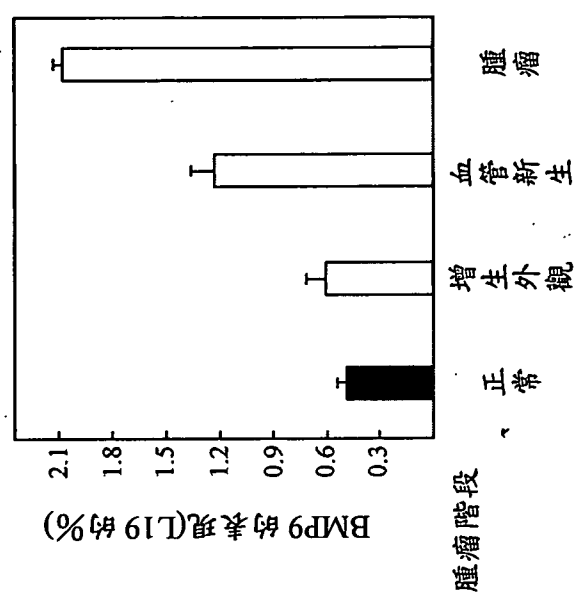
申請人製備之 ALK1-Fc 融合蛋白



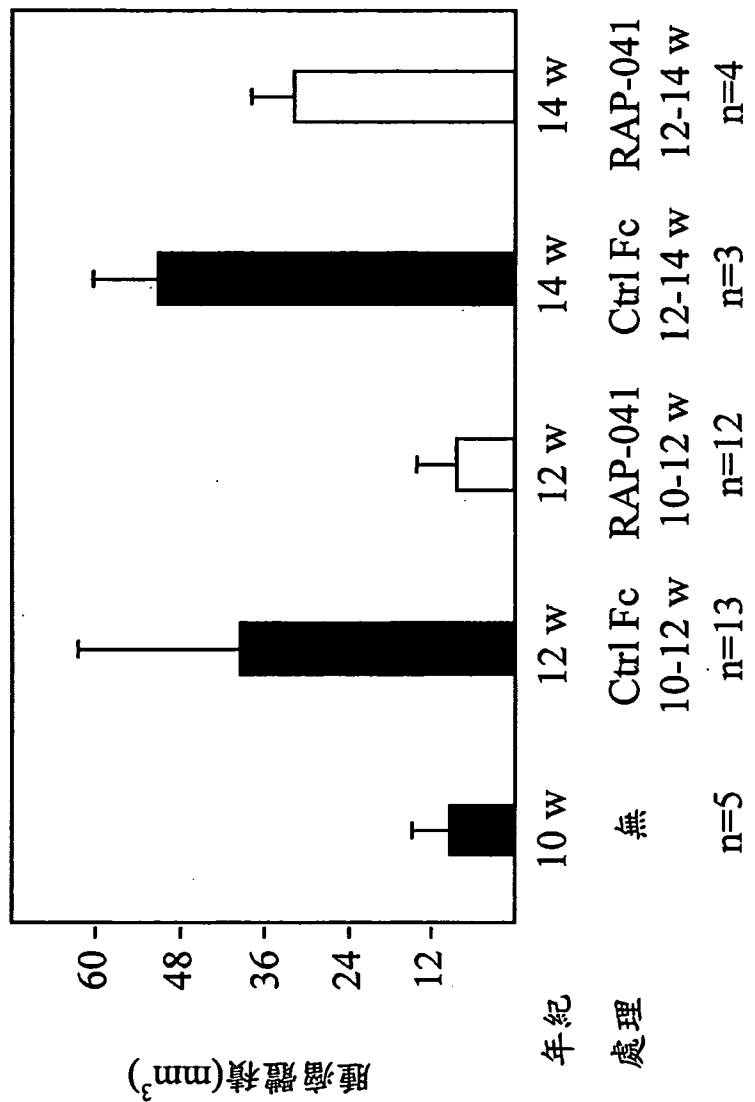
第11圖



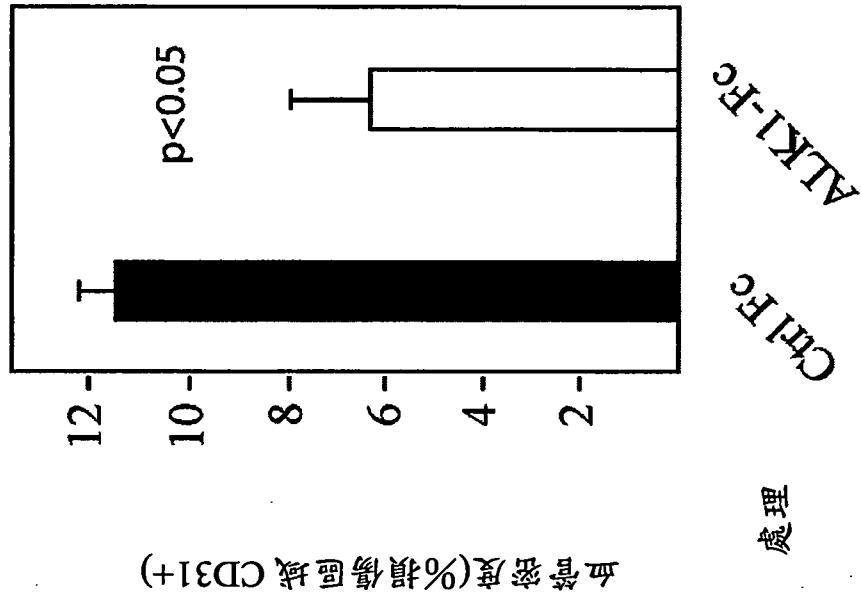
第 12 圖



第 13 圖

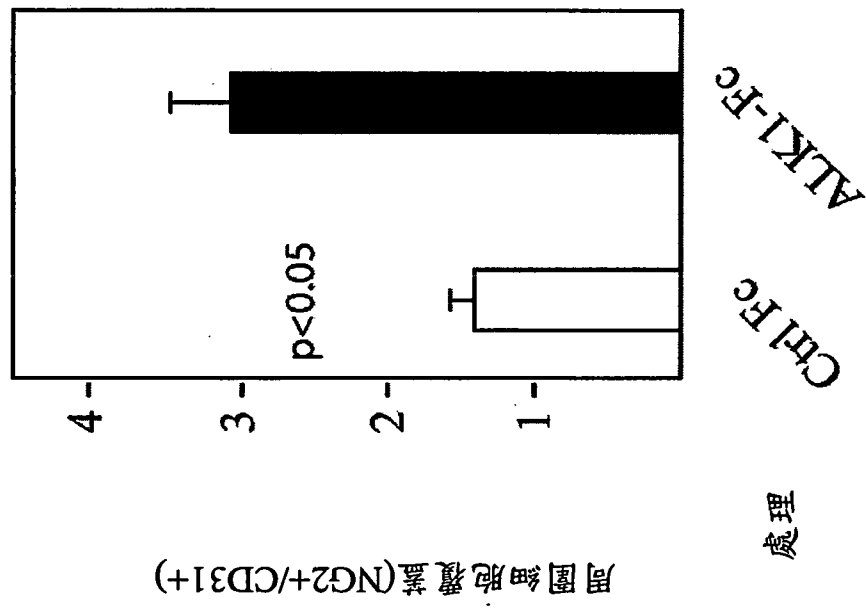


第 14 圖

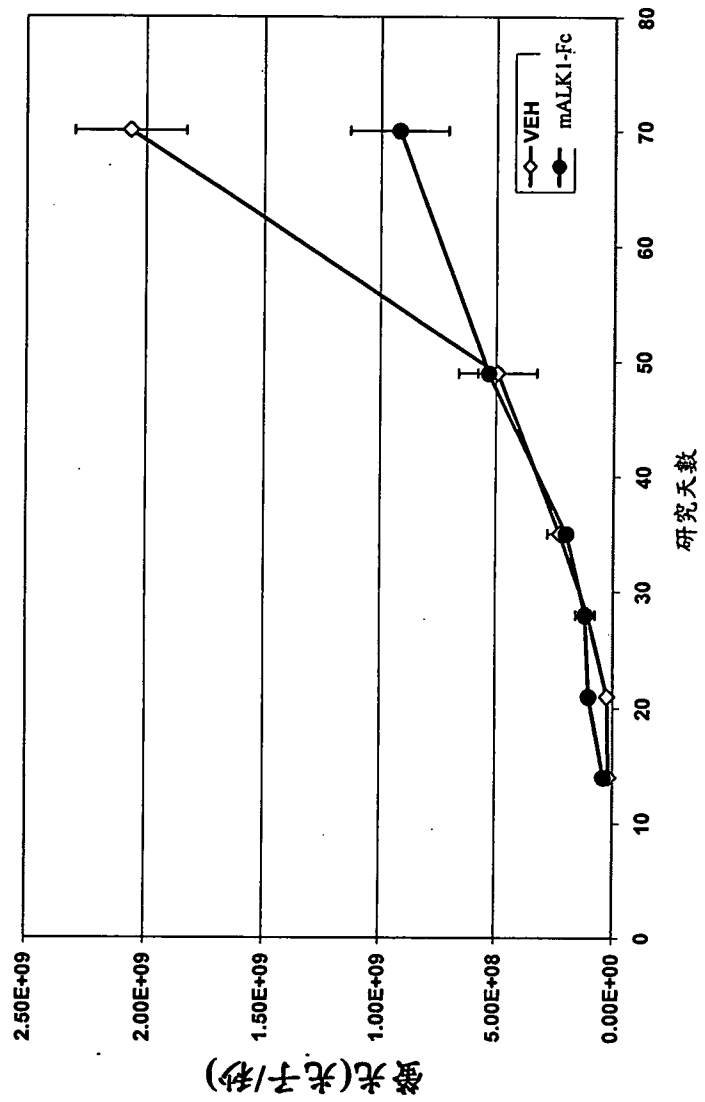


第 15 圖



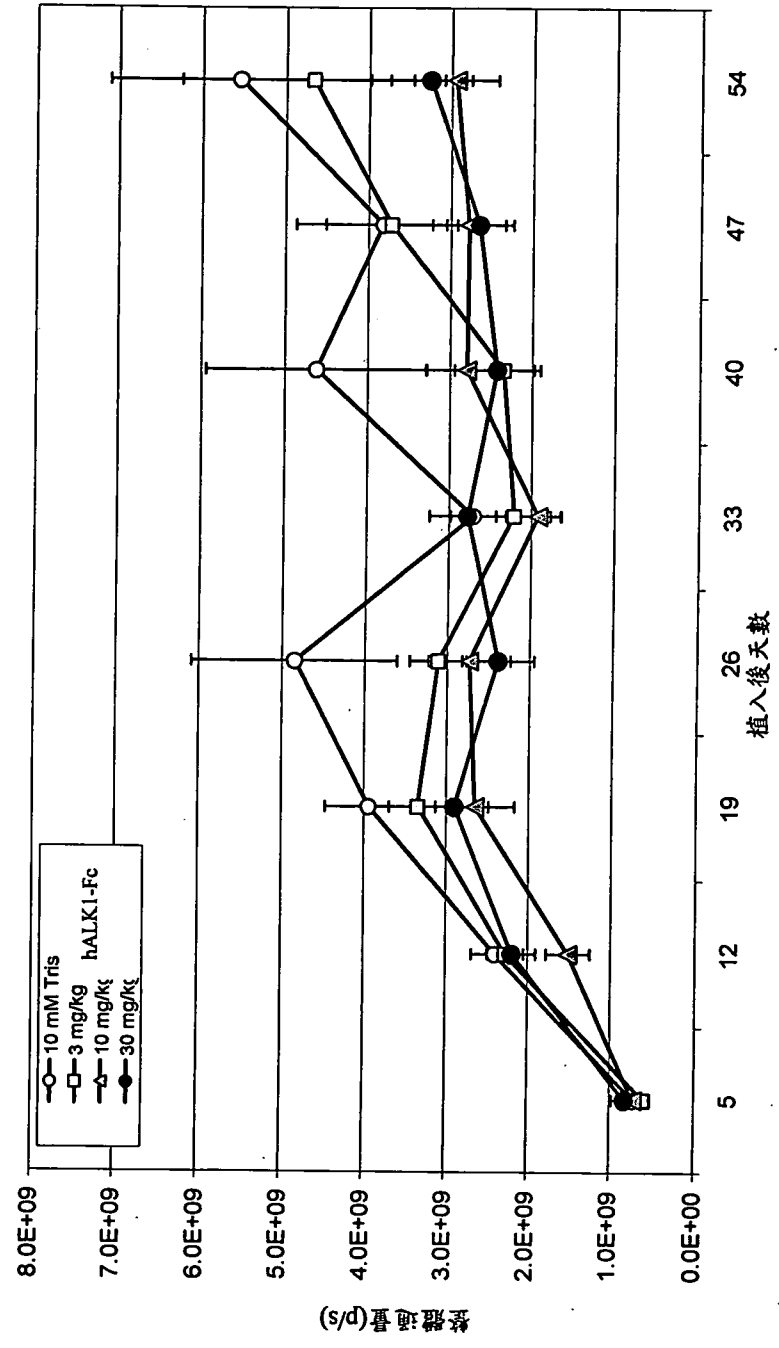


第 16 圖



第17圖

MCF-7-Luc:ACE-041 劑量反應



第 18 圖